

# **Desenvolvimento de pão sem glúten enriquecido com *Chlorella vulgaris***

**Joana Filipa Brígida Duarte**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Alimentar**

Orientadores: Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes

Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo

## **Júri:**

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes, Professora Auxiliar da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

## AGRADECIMENTOS

Durante a execução da presente dissertação pude contar com o apoio e a colaboração de muitas pessoas a quem gostaria de conceder os meus agradecimentos.

- ⇒ À minha orientadora Professora Doutora Cristiana Nunes, uma vez que se não fosse ela nunca teria sido possível a realização prática do meu trabalho. Agradeço do fundo do coração a ajuda prestada em todas as etapas da dissertação, pelo apoio, incentivo e por todos os conhecimentos que me permitiu adquirir.
- ⇒ À minha orientadora Professora Doutora Anabela Raymundo que se mostrou sempre disponível para me ajudar com qualquer dúvida, fazendo sempre críticas construtivas que me permitiram avançar com clareza no trabalho. Obrigada também pelo carinho demonstrado e por me ter dado incentivo neste trabalho.
- ⇒ À Engenheira Carla Graça e aos técnicos de laboratório do Edifício Ferreira Lapa (Diana e Daniel), pelo apoio e esclarecimento de dúvidas nos ensaios experimentais.
- ⇒ À minha família, aos meus pais, pelo apoio, paciência e confiança em mim, pois sem vocês não teria sido possível. A todos os meus amigos pelo apoio incondicional em todas as etapas.
- ⇒ A todos os colegas de mestrado pelo convívio durante o período de mestrado.
- ⇒ A todos os professores do Mestrado de Engenharia Alimentar pela transmissão de experiências e conhecimentos.
- ⇒ Às indústrias COPAM e DOW que cederam o amido de milho e o hidrocolóide HPMC, respetivamente.
- ⇒ A todos que não denominei e participaram direta ou indiretamente na concretização desta dissertação.

## RESUMO

Atualmente, devido ao aumento do número de pessoas intolerantes ao glúten, o mercado de produtos isentos de glúten tem vindo a crescer de modo muito relevante. No entanto, os produtos podem ser difíceis de encontrar, com preços muito elevados e nem sempre são muito favoráveis do ponto de vista sensorial. Muitas pessoas sem esta patologia também procuram produtos isentos de glúten. Por outro lado, também tem aumentado a procura de alimentos com ingredientes bioativos e as microalgas são reconhecidas como fonte de inúmeros fitoquímicos com impacto positivo na saúde humana. Desta forma, há necessidade de desenvolver produtos com o mesmo fim, que possam contribuir para a conformidade da dieta e a consequente qualidade de vida. A ausência do glúten no pão é uma questão tecnológica relevante, conduzindo à utilização de alternativas estruturantes no fabrico de pão, que possam mimetizar as propriedades tecnológicas assumidas pelo glúten.

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de pães isentos de glúten incorporados com a alga *Chlorella vulgaris*. Trata-se de uma microalga verde unicelular com propriedades biológicas e químicas importantes para a saúde humana. Ao longo do trabalho foi desenvolvida uma formulação controlada fundamentada em várias receitas, onde posteriormente foi incorporada a microalga. Realizaram-se estudos da textura e reologia das massas, aspeto geral e textura dos pães acompanhando o perfil de envelhecimento, da cor da massa e do pão,  $a_w$  (atividade da água) e humidade do miolo dos pães, volume e perdas na cozedura dos pães. A incorporação de biomassa microalgal originou produtos com características tecnológicas e sensoriais desejáveis, revelando-se promissora a sua utilização industrial.

**Palavras-chave:** pão isento de glúten, *Chlorella vulgaris*, textura, reologia, novos produtos alimentares.

## ABSTRACT

Currently, due to the increasing number of gluten intolerant people, the market for gluten-free products has progressed, however, the products might be hard to find, with high prices and are not always very favorable from a sensory point of view. Many people without this pathology also look for gluten-free products. On the other hand, demand for foods with bioactive ingredients has increased and microalgae are recognized as a source of countless phytochemicals with a positive impact on human health. Thus, there is a need to develop gluten-free products, which may contribute to diet compliance and the consequent quality of life. The removal of gluten in bread is a relevant technological issue, leading to the use of structural alternatives in bread making, which can mimic the technological properties of the gluten matrix.

The main objective of this work was the development of gluten-free bread incorporated with the algae *Chlorella vulgaris*. *Chlorella vulgaris* is a single-celled green microalga with biological and chemical properties important for human health. Throughout the work a base formulation was produced, based on several gluten-free recipes, which was subsequently improved with the addition of *C. vulgaris*. Tests were performed in terms of rheology and texture of the dough, general aspect and texture of the breads including aging profile, color of dough and breads,  $a_w$  (water activity) and humidity of the crumbles, volume and bake loss of the breads. The incorporation of the microalgae biomass originated products with desirable technological and sensorial characteristics.

**Key-words:** gluten-free bread, *Chlorella vulgaris*, texture, rheology, novel foods.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Glúten .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Doença celíaca.....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Prevalência .....	5
1.2.2. Manifestações clínicas .....	6
1.2.3. Diagnóstico .....	6
1.2.4. Tratamento.....	7
<b>1.3. Panificação Isenta de glúten.....</b>	<b>7</b>
1.3.1. Farinhas e amidos.....	8
1.3.2. Hidrocolóides .....	9
1.3.2.1. Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).....	9
1.3.3. Outros ingredientes.....	11
1.3.4. Principais etapas de fabrico de pão .....	13
<b>1.4. Microalgas.....</b>	<b>14</b>
1.4.1. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	14
1.4.1.1. Produção .....	15
1.4.1.2. Composição primária e benefícios .....	15
1.4.1.3. Aplicações na alimentação .....	17
1.4.2. <i>Tetraselmis chuii</i> .....	17
<b>1.5. Caracterização do pão: propriedades físicas e sensoriais.....</b>	<b>18</b>
1.5.1. Avaliação da textura .....	18
1.5.2. Avaliação das propriedades viscoelásticas.....	20
1.5.3. Análise sensorial .....	23
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Materiais .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Métodos.....</b>	<b>27</b>
2.2.1. Processo de fabrico do pão.....	27
2.2.2. Seleção da receita controlo – Ensaio preliminares.....	28
2.2.2.1. Formulações de pães isentos de glúten.....	28
2.2.3. Estudo do efeito das condições de processo e do teor de HPMC no pão controlo ..	28
2.2.4. Pães com incorporação de biomassa microalgal.....	29
2.2.5. Avaliação da textura da massa e do pão .....	30
2.2.6. Análise das propriedades viscoelásticas das massas.....	31
2.2.7. Análise instrumental da cor da massa, cor do miolo e da còdea do pão .....	32
2.2.8. Análise da atividade da água ( $a_w$ ) do miolo do pão .....	32
2.2.9. Análise da humidade do miolo do pão.....	33
2.2.10. Volume dos pães .....	33

2.2.11. Análise Sensorial .....	33
2.2.12. Análise Estatística.....	34
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
3.1. Seleção da receita controlo – Ensaio preliminares .....	35
3.2. Estudo do efeito das condições de processo e do teor de HPMC no pão controlo .....	36
3.2.1. Estudo do efeito do tempo de amassadura e do tempo-temperatura de cozedura na textura do pão controlo.....	36
3.2.2. Estudo do efeito do HPMC na textura do pão controlo .....	39
3.3. Incorporação de biomassa microalgal em formulações de pão sem glúten .....	41
3.3.1. Determinação do teor de absorção de água das formulações .....	41
3.3.2. Avaliação da textura da massa .....	43
3.3.3. Análise das propriedades viscoelásticas da massa.....	46
3.3.4. Avaliação da textura do pão .....	48
3.3.5. Evolução da textura do pão ao longo do armazenamento .....	50
3.3.6. Cor da massa e cor do miolo e da cêdea do pão.....	52
3.3.7. Análise da atividade da água, humidade, volume e perdas na cozedura do pão.....	55
3.4. Análise Sensorial .....	56
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Alteração histológica do intestino delgado. ....	5
Figura 2 – Fórmula química de HPMC. ....	10
Figura 3 – Microscopia da alga <i>Chlorella vulgaris</i> . ....	14
Figura 4 - Esquema representativo dos diferentes organelos da <i>C. vulgaris</i> . ....	14
Figura 5 - Microscopia da alga <i>Tetraselmis chuii</i> . ....	18
Figura 6 - Texturómetro TA.XT Plus a realizar um teste. ....	19
Figura 7 – Curva de Força vs Tempo obtida através de um Teste de TPA. ....	19
Figura 8 – Reómetro HAAKE MARS. ....	21
Figura 9 – Micro-doughLAB 2800. ....	22
Figura 10 – Curvas do Micro-doughLAB de farinhas com glúten fortes e fracas, utilizando o método padrão, com um torque alvo de $100 \pm 4$ mNm. ....	23
Figura 11 – Fluxograma do processo de produção do pão isento de glúten. ....	27
Figura 12 – Texturómetro a realizar um teste de perfil de textura (TPA) na massa com Cv, com uma sonda de 38mm Ø. ....	31
Figura 13 - Texturómetro a realizar um teste de perfil de textura (TPA) no pão controlo, com uma sonda de 10mm Ø. ....	31
Figura 14 – Reómetro com um sistema sensor de pratos paralelos serrados a realizar um teste de varrimento de frequências à massa controlo fermentada. ....	32
Figura 15 - Valores da firmeza do pão controlo produzido com diferentes tempos de amassadura. ....	37
Figura 16 - Valores da coesividade do pão controlo produzido com diferentes tempos de amassadura. ....	37
Figura 17 – Pães controlo com 4, 8 e 12 min de amassadura (da esquerda para a direita). ....	37
Figura 18 - Valores da firmeza do pão controlo produzido a diferentes tempos-temperaturas de cozedura. ....	38
Figura 19 - Valores da coesividade do pão controlo produzido a diferentes tempos-temperaturas de cozedura. ....	38
Figura 20 – Pães controlo com diferentes tempos-temperaturas de cozedura: (A) 60 min–160°C; (B) 50 min–180°C; (C) 50 min–200°C; (D) 30 min–160°C; (E) 30 min – 170°C; (F) 30 min–200°C. ....	39
Figura 21 - Valores da firmeza do pão controlo produzido com vários teores de HPMC. ....	40
Figura 22 - Valores da coesividade do pão controlo produzido com vários teores de HPMC. ....	40
Figura 23 - Pães controlo com 1%, 1,25% e 1,5% de HPMC (da esquerda para a direita). ....	40
Figura 24 - Curvas do Micro-doughLAB de todas as formulações para uma absorção de água de 78%. ....	41
Figura 25 - Curvas do Micro-doughLAB de todas as formulações finais. ....	42
Figura 26 – Valores da firmeza da massa não fermentada e fermentada, preparada com diferentes níveis de incorporação de <i>Chlorella vulgaris</i> . ....	43
Figura 27 – Valores da adesividade da massa não fermentada e fermentada, preparada com diferentes níveis de incorporação de <i>Chlorella vulgaris</i> . ....	44
Figura 28 – Valores da coesividade da massa não fermentada e fermentada, preparada com diferentes níveis de incorporação de <i>Chlorella vulgaris</i> . ....	45
Figura 29 - Massas fermentadas mix comercial, controlo, Cv 2,5%, Cv 3,75%, Cv 5% (da esquerda para a direita). ....	46
Figura 30 – Espetros mecânicos a 5°C, das massas fermentadas a 37°C, com diferentes teores de Cv e comparação com o controlo (sem microalga). ....	46

Figura 31 – Valores da firmeza, obtidos por TPA, dos pães com diferentes níveis de incorporação de Cv, do controlo (sem microalga) e do pão comercial.....	48
Figura 32 – Valores da coesividade, obtidos por TPA, dos pães com diferentes níveis de incorporação de Cv, do controlo (sem microalga) e do pão comercial. ....	49
Figura 33 – Pães mix comercial, controlo, Cv 2,5%, Cv 3,75%, Cv 5% e Tc 5% (da esquerda para a direita). ....	50
Figura 34 – Evolução da firmeza dos pães com incorporação de Cv, ao longo do armazenamento durante 48h à temperatura ambiente e comparação com o controlo e com o mix comercial. ....	50
Figura 35 – Massas não fermentadas: Mix comercial; Controlo; Cv 2,5%; Cv 3,75%; Cv 5%. ....	52
Figura 36 - Miolo dos pães: Mix comercial; Controlo; Cv 2,5%; Cv 3,75%; Cv 5%. ....	54
Figura 37 - Côdea dos pães: Mix Comercial; Controlo; Cv 2.5%; Cv 3.75%; Cv 5%. ....	55
Figura 38 - Pães analisados sensorialmente: controlo, Cv 2,5% e Cv 3,75%. ....	57
Figura 39 - Respostas dos provadores do painel sensorial (n = 26) em relação ao pão controlo e aos pães com Cv 2,5% e Cv 3,75%. ....	57

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro clínico da doença celíaca. ....	6
Tabela 2 – Parâmetros do Teste de TPA. ....	20
Tabela 3 – Composição nutricional da alga <i>Chlorella vulgaris</i> (Fonte: Allmicroalgae – Natural Products). ....	26
Tabela 4 – Composição nutricional da alga <i>Tetraselmis chuii</i> . ....	26
Tabela 5 – Formulações de pães sem glúten usados nos ensaios preliminares. ....	28
Tabela 6 - Formulações dos pães controlo sem glúten com diferentes teores de HPMC. ....	29
Tabela 7 – Formulações controlo e com incorporação de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Tetraselmis chuii</i> . ....	30
Tabela 8 – Resultados obtidos nos ensaios preliminares. ....	35
Tabela 9 – Torque final obtido para todas as formulações usando uma absorção de água de 78%. ....	41
Tabela 10 - Valores obtidos para o teor absorção de água a usar nas várias formulações (torque final= 7 mN.m). ....	42
Tabela 11 – Ajuste das Equações 1 e 2 aos espectros mecânicos das massas com diferentes teores de Cv e comparação com o controlo (sem microalga). ....	47
Tabela 12 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* das massas não fermentadas. ....	52
Tabela 13 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* e do parâmetro $\Delta E$ do miolo e da côdea do pão com diferentes níveis de incorporação de microalga. ....	53
Tabela 14 - Valores da atividade da água, humidade, volume e perdas na cozedura dos pães estudados. ....	55



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A2F – *Algae to Future*

DC – Doença Celíaca

APC – Associação Portuguesa de Celíacos

IgA – Imunoglobulina A

DIG – Dieta Isenta de Glúten

HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

WHO – Organização Mundial da Saúde

EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

JECFA - Comité Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares

DDA – Dose Diária Aceitável

Cv ou *C.vulgaris* – *Chlorella vulgaris*

Tc – *Tetraselmis chuii*

TPA – Análise do Perfil de Textura

WA – Absorção de água

$a_w$  – Atividade da Água

## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O presente trabalho constitui uma dissertação de 2ºCiclo e foi realizado no âmbito do projeto “A2F - *Algae To Future*”. Este é um projeto financiado pelo *Research Council of Norway* e conta com o envolvimento de 26 parceiros internacionais, incluindo a Universidade de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. A visão deste projeto é estabelecer as bases para a produção massiva de microalgas na Noruega, utilizando recursos naturais e fluxos de resíduos das linhas de produção existentes na agricultura, aquicultura e indústrias. O projeto A2F tenciona explorar o potencial das microalgas como novos ingredientes saudáveis para alimentação humana e animal, sendo também ingredientes sustentáveis tendo em conta a reduzida pegada de carbono do seu processo de produção. A equipa do Instituto Superior de Agronomia tem a seu cargo o desenvolvimento de pães isentos de glúten, com incorporação de microalgas com elevado teor proteico.

A doença celíaca é uma doença autoimune que afeta o intestino delgado de indivíduos geneticamente predispostos. As vilosidades tornam-se achatadas e inflamadas, dificultando a absorção. Consequentemente ocorrem dores abdominais, cólicas, inchaço e aumento de risco de linfoma (Hogen Esch. *et al.*, 2008). Estudos apoiam que a estimativa média de prevalência da doença celíaca é 1% da população mundial e que o tratamento para a doença celíaca, embora difícil de seguir, é a realização de uma dieta isenta de glúten (exclusão total de glúten em alimentos e suplementos alimentares) (Catassi *et al.*, 2008). Sabe-se que em Portugal a incidência desta patologia rondará os 3% da população, sendo uma doença ainda subdiagnosticada (APC, 2018).

Nos últimos anos tem-se verificado um interesse crescente em alimentos sem glúten, por pessoas celíacas ou não celíacas, em especial alimentos de padaria. Alguns investigadores defendem que a ingestão de grãos como a quinoa, amaranto, arroz selvagem e milho são considerados aceitáveis para os doentes celíacos, embora os investigadores considerem-nos pouco seguros (Lee *et al.*, 2003). Remover totalmente o glúten da dieta pode ser uma tarefa difícil, pois os produtos que contêm glúten são amplamente consumidos mundialmente e os produtos sem glúten podem ser difíceis de encontrar, apresentam um elevado custo e nem sempre são muito favoráveis do ponto de vista sensorial. Assim é necessário o desenvolvimento de novos produtos sem glúten para celíacos, que possam contribuir para a conformidade da dieta e a consequente qualidade de vida (Zandonadi *et al.*, 2009).

A ausência do glúten na produção do pão é uma questão tecnológica relevante,

conduzindo à utilização de alternativas estruturantes no fabrico de pão. Nos últimos quinze anos, têm vindo a ser realizados vários estudos com o objetivo de substituir o glúten por outros ingredientes que possam mimetizar as propriedades tecnológicas assumidas pela rede de glúten. A incorporação de farinhas sem glúten (de arroz, milho, quinoa, entre outros), de amidos, de proteínas de diferentes origens (albumina, ervilha, soja, entre outros), de proteínas lácteas, de fibras e de hidrocolóides têm sido estratégias usadas no desenvolvimento de produtos de panificação isentos de glúten (Naqash *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, têm sido realizados diversos trabalhos sobre o desenvolvimento de uma variedade de novos alimentos saudáveis e atraentes, preparados a partir de biomassa de microalgas (Batista *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2017; Gouveia *et al.*, 2007; Graça *et al.*, 2018). Muitas microalgas são ricas em pigmentos e em ácidos gordos polinsaturados ómega-3 com propriedades importantes para a saúde devido ao potencial antioxidante e anti-inflamatório. Assim, as microalgas apresentam um grande potencial de utilização como ingredientes funcionais em produtos alimentares, nomeadamente em produtos de panificação (Bernaerts *et al.*, 2017).

A *Chlorella vulgaris* é uma microalga verde unicelular com propriedades biológicas e químicas importantes para a saúde humana (Panahi *et al.*, 2016). Esta microalga é rica em nutrientes essenciais, especialmente proteínas, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais (Carlson, 2011). É uma fonte importante de ácidos gordos, principalmente de ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (35%), que diminuem o mau colesterol (LDL) e previnem várias doenças cardiovasculares. Diversos estudos sugerem que o consumo de *Chlorella vulgaris* ajuda a melhorar a hiperglicemia e a prevenir as doenças cardiovasculares e pulmonares (Panahi *et al.*, 2016). A adição da *Chlorella vulgaris* à massa do pão confere cor e torna-a mais atrativa sensorialmente e com possíveis benefícios para a saúde humana.

O principal objetivo do presente trabalho foi estudar a incorporação da microalga *Chlorella vulgaris* em pães sem glúten, estabelecendo os limites tecnológicos e os limites sensoriais dessa incorporação.

Ao longo do trabalho foi feito o desenvolvimento da receita controlo, a partir de receitas já estudadas por outros autores, e o estudo das condições de processo e do teor de hidrocolóide (HPMC). Posteriormente, foi realizada a incorporação de vários teores de *Chlorella vulgaris*. Cada uma destas fases do estudo foi realizada através da avaliação da textura e reologia das massas, aspeto geral e textura dos pães,  $a_w$  (atividade da água) e humidade do miolo, cor das massas e dos pães, volume e perdas

na cozedura dos pães. Finalmente, procedeu-se à análise sensorial dos pães selecionados recorrendo a um painel de 26 provadores não treinados.

O presente trabalho foi incluído nos seguintes resumos (anexos) submetidos a congressos:

- *Gluten-Free Bread with Microalgae Biomass Addition*, para o AlgaeEurope 2018.
- Incorporação de Biomassa Microalgal em Pão Isento de glúten: Avaliação do Impacto na Estrutura, para o XIV Encontro de Química dos Alimentos 2018.

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. Glúten**

Thomas Osborne foi o primeiro autor a classificar as proteínas de acordo com a sua solubilidade em: albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas (Atwell, 2011). O glúten é proveniente dos grãos de certos cereais, como o trigo, cevada, centeio e aveia, e que contém uma sequência específica de aminoácidos, na fração das prolaminas no trigo - as gliadinas; no centeio – as secalinas; na cevada – as hordeínas e na aveia – as aveninas) (Belitz *et al.*, 2009). As proteínas do trigo podem ser divididas em duas classes, as proteínas solúveis (albuminas e globulinas) e as proteínas de reserva (gliadinas e gluteninas) que possuem a capacidade de formar, durante a amassadura e juntamente com a água, uma substância elástica aderente, insolúvel em água, que é o glúten. O glúten é responsável pela textura da massa nos alimentos, devido à formação de redes viscoelásticas. As propriedades únicas de panificação do trigo são geralmente atribuídas às propriedades viscoelásticas das suas proteínas. As albuminas são solúveis em água, enquanto que as globulinas são solúveis em soluções salinas. Geralmente, as albuminas e globulinas não possuem um papel crítico na qualidade da farinha, embora tenha sido relatado que possuam alguma importância na qualidade da panificação (Schofield *et al.*, 1983). Ambas as frações proteicas são importantes do ponto de vista nutricional, devido ao alto teor de aminoácidos essenciais. As gluteninas são cadeias polipeptídicas, com subunidades de alto e baixo peso molecular, interligadas por pontes de dissulfureto que conferem elasticidade às massas. Enquanto que as gliadinas consistem em cadeias polipeptídicas monoméricas de baixo peso molecular, que quando hidratadas conferem extensibilidade à massa. O glúten é fundamental na elaboração de produtos panificáveis fermentados, pois a rede proteica do glúten é responsável pela retenção de dióxido de carbono produzido durante o processo de fermentação e de cozedura (Scheuer, *et al.*, 2011).

### **1.2. Doença celíaca**

A doença celíaca (DC) é uma doença autoimune que afeta o intestino delgado de indivíduos geneticamente predispostos. É caracterizada por uma resposta imune inadequada desencadeada pelas sequências de aminoácidos encontradas nas proteínas de armazenamento das sementes de alguns cereais, como o trigo, cevada e centeio. As proteínas denominadas como prolaminas são consideradas tóxicas para o doente celíaco e diferem de acordo com o tipo de cereal (Nascimento *et al.*, 2012). A ingestão de glúten, mesmo em pequenas quantidades, leva o organismo a desenvolver uma reação imunológica contra o próprio intestino delgado, provocando lesões na sua

mucosa, as vilosidades tornam-se achatadas e inflamadas (Figura 1), o que se traduz na diminuição da capacidade de absorção dos nutrientes. Consequentemente ocorrem dores abdominais, cólicas, inchaço e aumento de risco de linfoma (Hogen Esch. *et al.*, 2008). A origem da DC pode estar na interação de três fatores: ambientais (como por exemplo a introdução prematura do glúten na alimentação dos bebés), imunológicos e genéticos (APC, 2018). A provável prevalência da doença entre parentes de primeiro grau é de 10-15% (Preichardt *et al.*, 2013). A DC é mais comum em pacientes com outras doenças autoimunes, como diabetes mellitus tipo 1, dermatite herpetiforme e também tiroidite autoimune (APC, 2018).

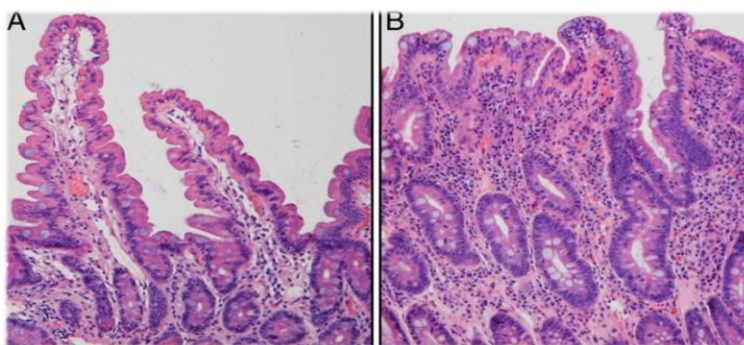


Figura 1 – Alteração histológica do intestino delgado.

(A) vilosidades intestinais com aspeto normal; (B) intestino delgado afetado pela DC, com hiperplasia das vilosidades e da cripta das vilosidades.

Fonte: Adaptado de <http://pedsinreview.aappublications.org/content/35/10/409>.

#### 1.2.1. Prevalência

Estudos apoiam que a estimativa média de prevalência da doença celíaca é 1% da população mundial. A prevalência no Reino Unido e na Europa Continental é de 1:100, enquanto na América do Norte essa proporção é de 1:300. Em Portugal, o único estudo efetuado na região de Braga obteve uma prevalência de 1:134, pelo que se estima que 1 a 3% da população portuguesa seja celíaca. No entanto, existem apenas cerca de 10.000 celíacos diagnosticados, o que indica que a DC é uma doença largamente subdiagnosticada (APC, 2018). Outras regiões (Japão, China), onde a doença é historicamente rara, começaram a relatar novos casos de DC (Zevallos *et al.*, 2013). Vários autores sugerem que a doença afeta duas vezes mais mulheres do que homens (Preichardt *et al.*, 2013).

### 1.2.2. Manifestações clínicas

Esta doença pode aparecer em qualquer idade desde que o glúten já tenha sido introduzido na alimentação, mas o habitual é surgir em crianças entre os 6 e os 20 meses de idade. Os sintomas mais comuns da DC variam conforme a idade, sendo que, dentro de cada faixa etária, podem também variar em frequência e intensidade. As crianças apresentam sintomas clássicos/típicos, como diarreia crónica, distensão abdominal, vômitos, atraso no crescimento e perda de peso ou aumento de peso insuficiente. Enquanto os adultos apresentam sintomas atípicos, como anemia e aftas recorrentes, cansaço crónico, dores ósseas e câibras, abortos recorrentes e dores abdominais recorrentes (APC, 2018).

A doença celíaca classifica-se da seguinte forma: clássica, atípica, silenciosa ou latente, consoante a presença de sintomas, anticorpos específicos, estudos genéticos e as características das biópsias. O quadro clínico pode apresentar-se como discriminado na Tabela 1.

Tabela 1 - Quadro clínico da doença celíaca.

	<b>Sintomas clínicos</b>	<b>Histologia</b>
<b>DC Clássica</b>	Diarreia Crónica, Distensão Abdominal, Atraso no Crescimento ou Perda Ponderal	Geralmente com atrofia das vilosidades intestinais
<b>DC Atípica</b>	Anemia Ferropénica, Osteoporose, Infertilidade, Neuropatia Periférica, Elevação das Transaminases	Grau de atrofia das vilosidades variável com alterações subtis da microarquitetura intestinal
<b>DC Silenciosa</b>	Assintomática ou com sintomas insuficientes que justifiquem suspeita clínica	Atrofia das vilosidades intestinais
<b>DC Latente</b>	Varia de assintomática a sintomas atípicos	Ausência de atrofia das vilosidades, presença de infiltração linfocitária

Fonte: Adaptado de Sabatino *et al.*, 2009.

### 1.2.3. Diagnóstico

O diagnóstico deve ser considerado em todos os indivíduos com um quadro clínico sugestivo de DC, especialmente aqueles que pertençam a uma das seguintes populações de alto risco para desenvolver a doença: parentes de primeiro grau de uma pessoa com caso confirmado de doença celíaca; presença de outras doenças autoimunes – como diabetes mellitus tipo 1, dermatite herpetiforme, tiroidite autoimune e deficiência de anticorpos IgA - e síndromes genéticas, como a Síndrome de Down (Ediger *et al.*, 2014). Sintomas gastrointestinais leves e predisposição ao gene podem ser uma indicação inicial da DC, que pode ser avaliada através testes serológicos de rastreio que são baseados em anticorpos. Os testes sorológicos mais sensíveis e

específicos para a doença celíaca são os anticorpos do tipo Imunoglobulina A anti-endomísio (IgA anti-EMA) e anti-transglutaminase tecidular (IgA anti-tTG) (Zevallos *et al.*, 2013). Os anticorpos IgA anti-tTG possuem uma sensibilidade de 98% e uma especificidade cerca de 90%. A sensibilidade dos anticorpos anti-EMA é menor (90%) porém são quase totalmente específicos para a doença celíaca (Zevallos *et al.*, 2013). Em pacientes com serologia positiva, o passo seguinte é a realização de uma biópsia duodenal, para confirmar a doença (Zevallos *et al.*, 2013).

#### 1.2.4. Tratamento

Atualmente, o tratamento para a doença celíaca consiste em seguir uma dieta isenta de glúten (DIG), de forma vitalícia (Catassi *et al.*, 2014). Este tratamento requer a educação do paciente bem como motivação e acompanhamento, por isso, é essencial que seja acompanhado por um nutricionista especializado e/ou associações de apoio à doença. Nos últimos 60 anos, a DIG provou ser eficaz no tratamento dos sintomas gastrointestinais como a diarreia, na resolução das deficiências nutricionais (como ferro e folato) e na normalização do crescimento e desenvolvimento. Demonstrou também ser segura e capaz de prevenir potenciais complicações da doença, incluindo o desenvolvimento de doenças autoimunes, osteoporose, infertilidade e linfoma intestinal (Catassi *et al.*, 2014). Uma dieta isenta de glúten, por definição, consiste na exclusão de todos os alimentos que contenham glúten, isto é, trigo, centeio, cevada e aveia. No entanto, existe controvérsia quanto à exclusão da aveia visto ter menor quantidade de prolaminas e cerca de metade dos resíduos de prolina que os outros três cereais. As deficiências nutricionais são comuns nos doentes celíacos e uma DIG pode revelar-se pobre em fibras, ferro, folato, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina e vitamina B12) e vitamina D (Catassi *et al.*, 2014). Os doentes celíacos devem por isso preferir os grãos sem glúten enriquecidos assim como o consumo de arroz, arroz selvagem, trigo-sarraceno, quinoa, amaranto, painço, sorgo e teff, devido ao elevado teor nutricional destes alimentos (Catassi *et al.*, 2014).

#### **1.3. Panificação Isenta de glúten**

Nos últimos anos tem-se verificado um interesse crescente em alimentos sem glúten, em especial alimentos de padaria. Devido ao aumento do número de pessoas com DC, o mercado de produtos isentos de glúten tem vindo a aumentar rapidamente devido à carência de produtos para doentes celíacos e aos elevados preços de mercado que os mesmos apresentam. Muitas pessoas sem esta patologia também procuram produtos isentos de glúten, por questões de moda e/ou de saúde.



Contudo, a produção de produtos de panificação sem glúten é considerada um grande desafio para a indústria e para os investigadores, visto que o desenvolvimento da matriz do glúten é que assegura uma boa qualidade do produto, principalmente do pão. A ausência do glúten no pão é uma questão tecnológica relevante, que tem conduzindo à utilização de alternativas estruturantes no fabrico de pão. Nos últimos quinze anos, têm vindo a ser realizados vários estudos com o objetivo de substituir o glúten por outros ingredientes que possam mimetizar as propriedades tecnológicas assumidas pelo glúten. A incorporação de cereais sem glúten e pseudocereais - arroz, milho, sorgo, trigo serraceno, amaranto e quinoa; amidos; proteínas de diferentes origens – albumina, colagénio, ervilha, soja, proteínas lácteas; fibras; e hidrocolóides são as principais estratégias que a comunidade científica e técnica tem usado para imitar as propriedades do glúten (Carini *et al.*, 2015). A ausência de glúten na panificação tem um grande impacto nas propriedades viscoelásticas da massa, dando origem a massas pegajosas, pouco coesas e elásticas, e consequentemente, a pães com miolo compacto com reduzida porosidade, baixo volume e textura desintegrada (Carini *et al.*, 2015). Infelizmente, os pães sem glúten estão normalmente associados a produtos caracterizados por qualidade sensorial inferior. Em particular, tem sido relatado que o pão sem glúten tem um tempo de prateleira mais curto do que o pão com glúten (Carini *et al.*, 2015). Outra desvantagem na produção destes produtos, é o facto da empresa produtora necessitar de uma linha exclusiva de panificação sem glúten, para que não haja contaminações cruzadas. Por outro lado, o processo de fabrico de massa sem glúten difere daquele utilizado para a produção de massa com glúten, geralmente devido às condições associadas à quantidade de água, que é responsável pela consistência da massa durante a operação de mistura, mas também afeta a massa e as propriedades de manuseamento e cozedura.

#### 1.3.1. Farinhas e amidos

Nas últimas décadas, têm sido utilizados vários produtos para substituir o glúten, incluindo o amido de arroz, amido de milho, amido de batata ou amido de mandioca e cereais como milho, arroz e sorgo, mas também produtos funcionais inovadores como os pseudocereais, leguminosas, sementes, entre outros. Geralmente, são utilizadas farinhas de arroz e milho, juntamente com várias técnicas e aditivos, para melhorar as propriedades físico-químicas, a aceitação, e o tempo de prateleira da massa e do pão (Wang *et al.*, 2017). Os pães sem glúten são principalmente materiais ricos em amido, onde a gelatinização do amido tem um efeito significativo na qualidade do pão. O amido tem um papel muito importante no processo de fabrico de pão isento de glúten. Durante

a cozedura os grânulos de amidos gelatinizam e apresentam a capacidade de reter bolhas de ar, facilitando a retenção do gás formado durante a fermentação. A gelatinização do amido ocorre eficientemente quando a água está presente em quantidade suficiente, por isso, muitas vezes as massas sem glúten apresentam mais semelhanças com as massas de bolos. Além disso, quando o amido gelatinizado está presente nas fases iniciais da panificação, ele pode contribuir significativamente para a consistência da massa (Wang *et al.*, 2017).

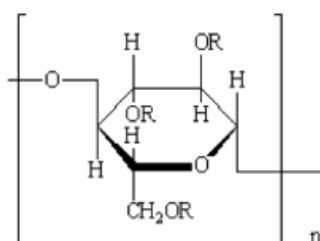
### 1.3.2. Hidrocolóides

Os hidrocolóides são proteínas e polissacarídeos solúveis em água com diversas estruturas químicas e fornecem uma ampla gama de propriedades funcionais, o que os torna adequados para diferentes aplicações na indústria de panificação (Mir *et al.*, 2016). Os hidrocolóides são utilizados nos pães sem glúten para melhorar as suas propriedades tecnológicas, sensoriais e nutricionais, e também o prazo de validade (Ronda *et al.*, 2015). São capazes de controlar a reologia e a textura de sistemas aquosos através da estabilização de emulsões, espumas e suspensões (Mir *et al.*, 2016), sendo usados como agentes estruturantes para imitar as propriedades viscoelásticas do glúten. Os hidrocolóides melhoram o desenvolvimento da massa e a retenção de gás através do aumento da viscosidade da suspensão (Mir *et al.*, 2016), produzindo pães sem glúten com melhor volume, textura e qualidade final. Portanto, as aplicações de hidrocolóides ou gomas em formulações de pão sem glúten são uma alternativa promissora para a expansão da produção de pães de alta qualidade. A magnitude do efeito do hidrocolóide nas propriedades da massa e do pão depende da estrutura química, quantidade utilizada, parâmetros do processo e das interações com os outros ingredientes utilizados durante a produção do pão sem glúten (Mir *et al.*, 2016). De entre os vários hidrocolóides, a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e goma xantana são os mais utilizados em pães sem glúten devido aos seus efeitos promissores na qualidade do produto final (Mancebo *et al.*, 2015). Outros hidrocolóides como a goma guar, carboximetilcelulose (CMC), goma de alfarroba e agarose são também utilizados nas massas sem glúten.

#### 1.3.2.1. Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

A hidroxipropilmetilcelulose é uma celulose obtida diretamente a partir de estirpes de material vegetal fibroso e parcialmente esterificado com grupos metilo e com uma pequena percentagem de grupos hidroxipropilo de substituição (EFSA, 2015). É uma metilcelulose modificada por tratamento com óxido de alcali e propileno, através

da qual um pequeno número de grupos 2-hidroxipropilo é ligado, através de ligações éter, às unidades anidroglicose da celulose, com a fórmula química da Figura 2 (FAO, 2011). Com denominação química de Éter 2-hidroxipropílico de metilcelulose. A fórmula geral é  $C_6H_7O_2(OR_1)(OR_2)(OR_3)$ .



R = H or CH<sub>3</sub> or CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>3</sub>

Figura 2 – Fórmula química de HPMC.  
Fonte: Adaptado de JECFA, 2011.

Em 1989, a HPMC (E 464) foi avaliada pelo Comité Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (JECFA) e durante a 35ª reunião foram definidas especificações para a identidade e pureza, no entanto não foi alocada uma dose diária aceitável (DDA). Em 1992, o Comité Científico da Alimentação Humana (SCF) emitiu um parecer sobre HPMC (E 464) e outras celulosas modificadas, mas também não considerou adequado estabelecer uma dose diária aceitável (DDA) numérica. As especificações atuais do HPMC estão estabelecidas no Regulamento (UE) n.º 231/2012 da Comissão, de 9 de março de 2012, que estabelece especificações para os aditivos alimentares enumerados nos anexos II e III do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho. Um dos critérios de pureza é a quantidade de "propilenocloridrina" (PCH) identificada como o resíduo formado nos amidos modificados por hidroxipropilação. O limite relatado para PCH é "não superior a 0,1 mg/kg". Em 2011, durante a sua 74ª reunião, o JECFA considerou possíveis mudanças nas especificações do HPMC. Devido ao desenvolvimento de um novo método analítico, o JECFA aumentou os níveis especificados de PCH para o novo limite de "não mais que 1,0 mg/kg" para a soma de ambos os isômeros em HPMC. De acordo com novos estudos do JECFA, juntamente com a estimativa anterior do Comité sobre ingestão de HPMC, indicaram que os níveis de cloridrinas de propileno até 1 mg/kg em HPMC não eram de preocupação toxicológica. No entanto, na União Europeia, o painel científico da EFSA, de acordo com estudos efetuados sobre a toxicidade da HPMC, concluiu que os dados disponíveis são insuficientes para suportar uma mudança na especificação de 0,1 para 1 mg de PCH/kg de HPMC (EFSA, 2015).

Recentemente, foram encontrados vários benefícios no consumo de HPMC para o organismo humano, entre eles a manutenção da função intestinal normal, a

uniformização dos níveis de açúcar no sangue e a manutenção de concentrações normais de colesterol no sangue (EFSA, 2015).

A incorporação de HPMC melhora a retenção de gás e a absorção de água da massa sem glúten, uma propriedade que é geralmente conferida pelo glúten (Ngemakwe *et al.*, 2014). A substituição dos grupos hidroxilo da celulose por metoxilo e hidroxipropilo aumenta a solubilidade na água e a afinidade com a fase não polar, aumentando o caráter anfifílico da HPMC. Este duplo papel permite manter a massa uniforme e a emulsão estável durante o fabrico de pão. A melhoria da retenção de gás é atribuída à formação de filmes interfaciais nos limites das células de gás conferindo alguma estabilidade contra a expansão de gás (Ngemakwe *et al.*, 2014).

A adição de HPMC em formulações de pão sem glúten aumenta o teor de humidade do miolo e o volume de pão, reduz a velocidade de endurecimento do miolo, melhora a textura do miolo e as propriedades sensoriais (Ngemakwe *et al.*, 2014).

A capacidade do HPMC de melhorar a relação volume/massa do pão deve-se à libertação de moléculas de água, permitindo uma interação mais forte entre as cadeias, quando expostas a temperaturas altas. Como resultado, há a criação de uma rede temporária que se desintegra sob condições de arrefecimento (Ngemakwe *et al.*, 2014). A massa expande-se durante a cozedura, as perdas de gás são reduzidas e o volume aumenta devido ao fortalecimento das células de gás criadas pela rede de HPMC. Esta barreira para difusão de gás de HPMC diminui as perdas de vapor de água e aumenta o teor final de humidade do pão e proporciona uma melhor textura sem nenhum impacto adverso no produto fresco (Ngemakwe *et al.*, 2014).

A análise microestrutural mostrou uma possível interação entre a HPMC e os constituintes do pão e a capacidade de interagir com a água efetiva presente no sistema, realizando assim uma função anti-endurecimento (Ngemakwe *et al.*, 2014). O impacto suavizante da HPMC é atribuído à sua capacidade de retenção de água e à inibição da retrogradação da amilopectina, uma vez que a HPMC preferencialmente liga-se ao amido (Ngemakwe *et al.*, 2014), reduzindo a taxa de endurecimento. O efeito de melhoria da HPMC na qualidade sensorial do pão é atribuído ao seu efeito amaciador da textura do miolo (Ngemakwe *et al.*, 2014).

### 1.3.3. Outros ingredientes

A água influencia a consistência, a reologia e a temperatura da massa. Hidrata proteínas e hidratos de carbono para o desenvolvimento da massa e, portanto, age como um agente dispersivo, colocando os ingredientes em contato uns com os outros e dissolvendo os ingredientes solúveis. A massa é formada quando se mistura água e

farinha, resultando na ativação de enzimas, como as amílases para a degradação do amido e produção de açúcar. A água hidrata as frações proteicas que também auxiliam no desenvolvimento da viscoelasticidade da massa e afeta a gelatinização do amido durante a cozedura (Wang *et al.*, 2004). A quantidade de água adicionada durante a mistura de massa depende principalmente da absorção de água da farinha sem glúten. Assim, a absorção de água aumenta com o aumento do grau de extração da farinha, devido ao aumento do teor de proteína. A partir de certo nível, a adição de água reduz a viscosidade e aumenta a extensibilidade da massa. O teor de água e sua distribuição, portanto, desempenham um papel importante nas propriedades de textura do pão, como maciez do miolo, o crocante da crosta e o prazo de validade (Wang *et al.*, 2004).

O sal é adicionado a cerca de 1,5% do peso da farinha isenta de glúten para melhorar o paladar (Ngemakwe *et al.*, 2014) e para melhorar o manuseamento da massa. O sal retarda a absorção da água e o inchamento das proteínas da farinha, reduz a extensibilidade da massa, melhora a retenção de gás e melhora o miolo do pão e as propriedades de corte.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* adicionada a cerca de 2% de concentração (em relação à farinha sem glúten) é utilizada na indústria de panificação pela sua capacidade de produzir gás através do metabolismo da glucose (Ngemakwe *et al.*, 2014). A levedura fermenta a glucose para produzir dióxido de carbono e etanol sob condições anaeróbicas. A levedura também contribui para o sabor dos produtos de panificação, pelos subprodutos de fermentação produzidos através da libertação de açúcares redutores que reagem com os grupos amino de proteínas durante a cozedura (Ngemakwe *et al.*, 2014). A *S. cerevisiae* é considerada uma das principais leveduras utilizadas na fermentação de produtos panificáveis e tem um efeito importante nas propriedades reológicas da massa.

Os principais ingredientes opcionais utilizados na indústria de panificação sem glúten são a gordura, o açúcar, os emulsionantes, os agentes oxidantes, os agentes redutores, as enzimas e aceleradores de fermentação (Ngemakwe *et al.*, 2014). A gordura usada em pequenas quantidades (até cerca de 3% do peso da farinha) torna o miolo mais fino e sedoso e aumenta o volume do pão e a retenção de frescura. O açúcar melhora a fermentação, o escurecimento (Reacções de Maillard), a estabilidade e elasticidade da massa. Os emulsionantes podem ser agentes dispersantes (lecitina, lecitina hidroxilada), melhoradores de volume, reforçadores de massa (polissorbato 60) e/ou amaciadores de miolo (monoacilgliceróis e diacilgliceróis).

#### 1.3.4. Principais etapas de fabrico de pão

O fabrico de pão sem glúten compreende várias etapas, no entanto as etapas principais são a amassadura, fermentação e cozedura.

O principal objetivo da amassadura é a mistura e homogeneização de todos os ingredientes para possibilitar a hidratação da farinha e a incorporação de ar que irá permitir o desenvolvimento da massa. Os lípidos são uniformemente distribuídos e colocados em contato com as fibras proteicas, e os materiais solúveis são totalmente dissolvidos e distribuídos na matriz aquosa. A amassadura influencia a viscoelasticidade da massa e a incorporação de ar necessária à formação das bolhas de gás durante a fermentação (Heller, 2009).

A etapa seguinte é a fermentação que ocorre entre 32° e 37°C numa estufa, pois é a temperatura ótima para a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) se multiplicar produzindo açúcares livres a partir do amido. Os produtos resultantes da fermentação são o álcool (etanol), gás (dióxido de carbono) e compostos secundários (ácidos orgânicos, álcoois e ésteres), associados ao sabor e aroma do pão. Durante a fermentação, o gás produzido pela levedura provoca a expansão das células de gás. O desempenho fermentativo das células de levedura durante a fermentação é de extrema importância para a qualidade final do pão, uma vez que o dióxido de carbono e outros metabolitos influenciam a reologia da massa e a textura, volume e sabor do pão (Struyf *et al.*, 2017). Como a estabilidade e o crescimento das bolhas de gás geradas determinam o volume do pão, assim como a textura do produto, qualquer modificação durante a fase de fermentação pode alterar a estrutura do miolo do produto (Ngemakwe *et al.*, 2014).

Por último, ocorre a etapa de cozedura a temperaturas entre 160° e 220°C. Numa primeira fase, ocorre a expansão da massa, devido ao aumento da temperatura, resultando numa maior atividade da levedura e, conseqüentemente, uma maior produção de gás. Os gases provenientes da fermentação aumentam de volume, o etanol e a água evaporam e o dióxido de carbono vai-se difundido até à superfície da massa, fazendo com que esta aumente de volume. Esta fase é denominada por *oven-spring* (Heller, 2009). Quando se atinge a temperatura de 60°C, ocorre a morte térmica das células de levedura e inicia-se a gelatinização do amido e a desnaturação das proteínas. As temperaturas de cozedura favorecem reações que levam ao escurecimento da còdea e ao desenvolvimento do aroma e sabor característicos do pão, como é o caso das reações de caramelização dos açúcares, das reações de Maillard e da dextrinização do amido (Heller, 2009).

## 1.4. Microalgas

### 1.4.1. *Chlorella vulgaris*

A *Chlorella vulgaris* (Cv) é uma microalga verde unicelular com propriedades biológicas e químicas importantes para a saúde humana (Panahi *et al.*, 2016). *C. vulgaris*, morfologicamente, é uma célula microscópica esférica com 2-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Safi *et al.*, 2014) (Figura 3) e tem muitos elementos estruturais semelhantes às plantas: Parede Celular, Citoplasma - Mitocôndria, Cloroplasto (Figura 4). É uma célula reprodutora não móvel que se reproduz assexuadamente e rapidamente. Assim, em 24 horas, uma célula de Cv cultivada em condições ótimas multiplica-se por autosporeação, que é a reprodução assexuada mais comum em algas.

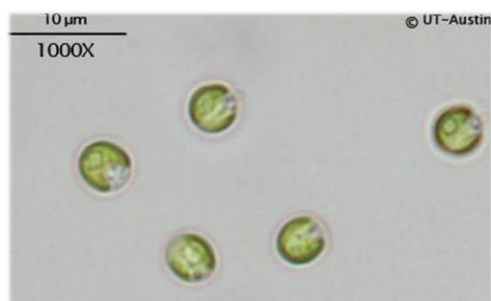


Figura 3 – Microscopia da alga *Chlorella vulgaris*.  
Fonte: Adaptado de UTEX, 2018.

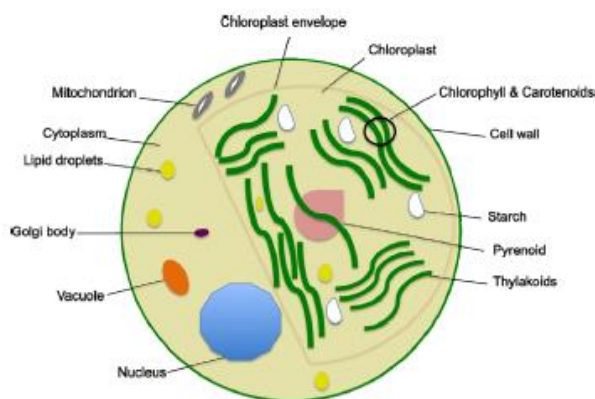


Figura 4 - Esquema representativo dos diferentes organelos da *C. vulgaris*.  
Fonte: Adaptado de Safi *et al.*, 2014.

#### 1.4.1.1. Produção

A produção comercial de *Cv* começou no Japão em 1960 e, hoje em dia, esta microalga é amplamente produzida e comercializada como suplemento alimentar em muitos países, incluindo a China, o Japão, a Europa e os EUA (Batista *et al.*, 2013). Em 2009, a produção anual de *C. vulgaris* atingiu as 2000 toneladas (peso seco) e os principais produtores são o Japão, Alemanha e Taiwan. A *C. vulgaris* tem condições propícias para a produção porque é notavelmente resistente a condições adversas e invasores. O conteúdo de lípidos e amido aumenta e a produtividade da biomassa cessa ou diminui (Safi *et al.*, 2014) durante condições de crescimento desfavoráveis, como presença de azoto e fósforo, alta concentração de CO<sub>2</sub>, exposição excessiva à luz, excesso de ferro no meio ou aumento da temperatura. Por outro lado, o teor de proteína aumenta durante condições de crescimento normal e controladas (suplementação de azoto). Assim, foram testadas várias técnicas de crescimento, com o objetivo de aumentar a produtividade da biomassa e aumentar o conteúdo de lípidos, proteínas, hidratos de carbono e pigmentos. Essas técnicas podem ser de crescimento autotrófico ou crescimento heterotrófico. Exemplos de técnicas de crescimento autotróficos são os sistemas de lagos abertos e o foto-biorreator fechado (ambiente controlado, para obter uma maior concentração de células). A técnica de sistemas de lagos abertos é a mais comum, por ser a mais barata para a produção da alga em elevada escala. Estes sistemas são categorizados como águas naturais (lagos e lagoas), águas residuais, lagoas artificiais ou recipientes, com exposição fácil à luz solar e uma profundidade ótima da lagoa é de 15 a 50 cm (Safi *et al.*, 2014). Contudo, para uso alimentar só podem ser usados sistemas fechados devido ao risco de contaminação.

#### 1.4.1.2. Composição primária e benefícios

A microalga *Chlorella vulgaris* é rica em nutrientes fundamentais para a dieta humana, especialmente proteínas, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais (Carlson, 2011).

O teor total de proteínas na *C. vulgaris* representa 42-58% do peso seco de biomassa e varia de acordo com as condições de crescimento (Safi *et al.*, 2014). A qualidade nutricional da proteína é determinada de acordo com o seu perfil de aminoácidos (Safi *et al.*, 2014) e, como a maioria das microalgas, o seu perfil de aminoácidos é melhor do que o perfil padrão de nutrição humana proposto pela WHO (Organização Mundial da Saúde) e FAO (Organização das Nações Unidas para



Agricultura e Alimentação), pois as células de *C. vulgaris* podem sintetizar aminoácidos essenciais e não essenciais.

Sob condições ótimas de crescimento, *C. vulgaris* pode atingir 5-40% de lipídios por peso seco de biomassa (Safi *et al.*, 2014), e são compostos principalmente por glicolípidos, ceras, hidrocarbonetos, fosfolípidos e pequenas quantidades de ácidos gordos livres (Safi *et al.*, 2014). É uma fonte importante de ácidos gordos, principalmente de ácidos gordos polinsaturados ômega-3 (35%), que diminuem o mau colesterol (LDL) e previnem as doenças cardiovasculares. Diversos estudos sugerem que o consumo de *Chlorella vulgaris* ajuda a melhorar a hiperglicemia e a prevenir as doenças cardiovasculares e pulmonares (Panahi *et al.*, 2016).

Os hidratos de carbono da Cv representam um grupo de açúcares redutores e polissacarídeos, como amido e celulose. O amido é o polissacarídeo mais abundante na *C. vulgaris*. Geralmente está localizado no cloroplasto e é composto por amilose e amilopectina e, juntamente com os açúcares, servem como armazenamento de energia para as células. A celulose é um polissacarídeo estrutural de alta resistência, localizado na parede celular de *C. vulgaris* como barreira fibrosa protetora. Além disso, um dos polissacarídeos mais importantes presentes em *C. vulgaris* é o  $\beta 1 \rightarrow 3$  glucano (Safi *et al.*, 2014), que tem múltiplos benefícios nutricionais para saúde.

O pigmento mais abundante é a clorofila, que pode atingir 1 a 2% do peso seco e está situada nos tilacóides. *C. vulgaris* também contém quantidades importantes de carotenóides, como o  $\beta$ -caroteno, que atuam como pigmentos acessórios pela captura de luz. Estes pigmentos têm múltiplas propriedades terapêuticas, como atividades antioxidantes (Gouveia *et al.*, 2005), efeito protetor contra a degeneração da retina (Safi *et al.*, 2014), regulação do colesterol sanguíneo, prevenção de doenças crônicas (como as cardiovasculares) e fortalecimento do sistema imunitário (Safi *et al.*, 2014). Os carotenóides têm a capacidade de extinguir os radicais livres, protegendo assim as células e tecidos contra danos oxidativos. Assim, são úteis na prevenção da deterioração dos alimentos durante o processamento e armazenamento.

Os principais minerais presentes na *C. vulgaris* são o fósforo, magnésio, cálcio e potássio. Estes minerais desempenham papéis funcionais importantes nos seres humanos. *C. vulgaris* tem um importante perfil vitamínico – vitaminas do complexo B, vitamina A, vitamina C e a D - que são elementos chave para o crescimento e diferenciação celular no corpo humano (Vit. A), com atividade antioxidante que age como removedor de radicais livres, melhorando a circulação sanguínea e controlando as funções musculares (Vit. C e E) (Safi *et al.*, 2014). O complexo da vitamina B é o principal fator para a atividade de enzimas no metabolismo, promove o crescimento das

células vermelhas do sangue, reduz o risco de cancro no pâncreas e mantém a pele, cabelo e músculos saudáveis.

#### 1.4.1.3. Aplicações na alimentação

A *Chlorella vulgaris* pode ser encontrada no mercado como suplemento alimentar ou aditivo (Fradique *et al.*, 2010), corante e emulsionante de alimentos (Safi *et al.*, 2014). Estes produtos podem ter diferentes formas, tais como cápsulas, comprimidos, extratos e pó. Assume uma relevância especial para ser utilizada como ingrediente alimentar, uma vez que é permitida pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). Visto que tem um histórico de utilização na União Europeia antes de 1997 e, por conseguinte, não se insere no âmbito de aplicação do Regulamento (CE) n.º 258/97 e Regulamento (UE) n.º 2283/2015, relativos a novos alimentos e novos ingredientes alimentares.

Vários produtos tradicionais, como massas (Fradique *et al.*, 2010), biscoitos (Gouveia *et al.*, 2007; Gouveia *et al.*, 2008b), pudins/sobremesas gelificadas (Batista *et al.*, 2008) e maioneses/molhos para salada (Gouveia *et al.*, 2006; Raymundo *et al.*, 2005) foram desenvolvidos com a incorporação de microalgas na sua formulação e as expectativas sobre essa prática são promissoras para a indústria de alimentos. No entanto, poucos estudos foram realizados sobre a incorporação de microalgas no pão com (Graça *et al.*, 2018) e sem glúten, apesar do seu alto interesse como alimento básico de grande importância na alimentação humana. A *Chlorella vulgaris* é uma fonte de hidratos de carbono, proteínas, fibras alimentares, vitaminas, micronutrientes e antioxidantes, sendo apreciado pelo seu sabor, versatilidade, conveniência, textura e aparência (Graça *et al.*, 2018).

#### 1.4.2. *Tetraselmis chuii*

A *Tetraselmis chuii* (Figura 5) é uma alga verde unicelular marinha móvel, de 10 a 15 µm de tamanho, com formato elipsoidal que se reproduz por fissão longitudinal. A classificação taxonómica da microalga *Tetraselmis chuii* é a seguinte (Butcher, 1959): Reino – *Plantae*; Filo – *Chlorophyta*; Classe – *Prasinophyceae*; Ordem – *Chlorodendrales*; Família – *Chlorodendraceae*; Género – *Tetraselmis*.



Figura 5 - Microscopia da alga *Tetraselmis chuii*.  
Fonte: Adaptado de UTEX, 2018.

A *Tetraselmis chuii* (Tc) foi isolada pela primeira vez na Grã-Bretanha por Butcher em 1959, e posteriormente foi isolada em diferentes partes do mundo. A empresa Fitoplacton Marino S.L. solicitou autorização para a comercialização na União Europeia da microalga *Tetraselmis chuii*, como tempero para dar sabor a diferentes pratos cozinhados, em pó, incorporada em sal e como ingrediente de molhos. A incorporação da microalga *Tetraselmis chuii* foi aprovada, de acordo com o Regulamento (UE) n.º 2283/2015, contudo não é permitido a aplicação do liofilizado no pão.

## 1.5. Caracterização do pão: propriedades físicas e sensoriais

### 1.5.1. Avaliação da textura

A textura é o conjunto de propriedades físicas, percebidas sensorialmente através do tato, visão e audição, que são consequência da estrutura interna do material que, por sua vez, é determinada pelas interações moleculares dos seus constituintes (Sousa, 2001). A textura é muito importante na aceitabilidade geral dos produtos por parte dos consumidores. A propriedade da textura mais relevante nos produtos de panificação é a firmeza ou dureza. A firmeza ou dureza é uma propriedade física de materiais utilizada na avaliação instrumental da textura dos alimentos. Normalmente, o termo dureza é associado a materiais predominantemente sólidos (como os frutos) e o termo firmeza a alimentos menos firmes (como a massa de pão ou o pão), no entanto, os dois conceitos apresentam o mesmo significado físico (Sousa, 2001).

O texturómetro (Figura 6) é um instrumento que simula a ação da mastigação na boca humana, num ensaio empírico, que foi desenvolvido pela *General Foods Technical Center, Tarrytown, N.Y.* (Friedman *et al.*, 1963). Este equipamento é composto por um dinamómetro, que fornece ao material em análise energia mecânica a uma taxa constante, através de uma sonda que contacta com a amostra e deforma o alimento através de um processo de compressão, penetração ou tração.



Figura 6 - Texturómetro TA.XT Plus a realizar um teste.

Fonte: Adaptado de <http://texturetechnologies.com/texture-analyzers/ta-xtplus-texture-analyzer>.

A Análise do Perfil de Textura (TPA – *Texture Profile Analysis*) foi desenvolvida nos anos 60 para estudar as propriedades mecânicas dos alimentos e a sua relação com a textura. Este teste imita as condições a que os alimentos são submetidos durante o processo de mastigação, envolvendo duas penetrações ou compressões intervaladas entre si, simulando a ação de duas dentadas no alimento, e assim também é conhecido como o teste das duas dentadas (Sousa, 2001). Os parâmetros calculados a partir da Análise do Perfil de Textura estão definidos na Tabela 2, destacando-se para o pão a firmeza, adesividade e coesividade, que têm sido amplamente utilizados para comparação dos atributos sensoriais e propriedades reológicas de diversos alimentos (Friedman *et al.*, 1963). A partir deste teste obtém-se um texturograma, que pode ser representado através da Força *versus* Tempo (Figura 7) ou de Força *versus* Distância.

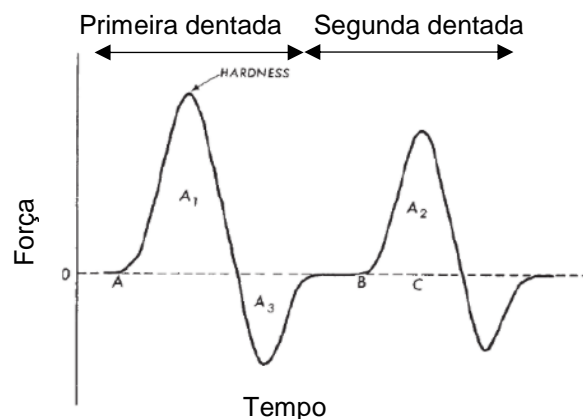


Figura 7 – Curva de Força vs Tempo obtida através de um Teste de TPA.

Fonte: Adaptado de Friedman, *et al.*, 1963.

Tabela 2 – Parâmetros do Teste de TPA.

Parâmetros	Definição	Medição
<b>Firmeza</b>	Força máxima durante a primeira compressão/penetração. Não precisa de ocorrer no ponto de compressão/penetração mais profundo, embora normalmente o seja para a maioria dos produtos.	Pico máximo na primeira compressão
<b>Adesividade</b>	Trabalho necessário para ultrapassar as forças de atração entre o produto e a superfície da sonda.	Área negativa entre os dois ciclos - $A_3$
<b>Coesividade</b>	Como o produto resiste a uma segunda deformação em relação à sua resistência à primeira deformação.	$\frac{\text{Área 2 (A2)}}{\text{Área 1 (A1)}}$
<b>Fracturabilidade</b>	Nem todos os produtos fraturam, mas o ponto de fracturabilidade ocorre quando o gráfico tem seu primeiro pico significativo (onde a força cai) durante a primeira compressão/penetração do produto pela sonda.	Força no primeiro pico em $F_1$
<b>Elasticidade</b>	Como o produto recupera fisicamente entre a primeira compressão e o início da segunda.	$\frac{\text{Distância 2 (A2)}}{\text{Distância 1 (A1)}}$ ou $\frac{\text{Tempo 2 (A2)}}{\text{Tempo 1 (A1)}}$
<b>Gomosidade</b>	Está relacionada com a mastigabilidade, desde que o produto não seja um semi-sólido e um sólido ao mesmo tempo. Só se aplica a semi-sólidos.	Coesividade x Firmeza
<b>Mastigabilidade</b>	Está relacionada com a gomosidade, desde que o produto não seja um semi-sólido e um sólido ao mesmo tempo. Só se aplica a sólidos.	Gomosidade x Elasticidade

Fonte: Adaptado de <http://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis#tpa-measurements>.

### 1.5.2. Avaliação das propriedades viscoelásticas

A reologia é a ciência que estuda o escoamento e a deformação dos materiais, quando solicitados por uma tensão. A reologia pode ser aplicada em sólidos, líquidos, espumas, emulsões, géis e materiais fundidos. As propriedades reológicas são caracterizadas analisando a relação entre uma solicitação mecânica e a resposta do material. Esta resulta numa deformação, se for sólido, ou num escoamento, se for líquido. Nos materiais sólidos a propriedade reológica de interesse é a elasticidade, enquanto que nos líquidos é a viscosidade. No entanto, existem materiais que combinam simultaneamente as características de um fluido viscoso com as de um sólido elástico, sendo estes denominados de viscoelásticos, como as massas de panificação (Sousa, 2001).

A caracterização reológica dos materiais é feita tendo em conta três estados estruturais: o estado sólido elástico, o fluido Newtoniano e o material viscoelástico. No sólido elástico, também designado como sólido de Hooke, existe uma relação proporcional entre a tensão e a deformação e independente do tempo, e após remoção

da tensão aplicada verifica-se uma recuperação total da deformação do material (Castro, 2003). O fluido perfeito ou fluido de Newton é um fluido incompressível onde não pode existir nenhuma tensão tangencial. A viscosidade é a resistência ao escoamento, resultante do atrito interno entre camadas de fluido. Os fluidos perfeitos seguem a lei de Newton, segundo a qual a viscosidade é constante. No entanto, a maioria dos produtos alimentares apresentam viscosidades que variam com a velocidade de deformação e, portanto, são classificados como fluidos não newtonianos que se comportam como materiais viscoelásticos, combinando as características de um fluido viscoso com as de um sólido elástico. Para determinar o comportamento viscoelástico são utilizados vários testes, como os testes estáticos e os testes dinâmicos ou oscilatórios. Os testes estáticos são os testes de relaxação da tensão e os testes de fluência (*creep*). Os testes dinâmicos ou oscilatórios são particularmente úteis para caracterizar a conformação macromolecular e interações intermoleculares em solução. Nos testes dinâmicos ou oscilatórios, aplica-se uma tensão ou uma deformação que varia sinusoidalmente com o tempo, a uma dada frequência, e regista-se a deformação ou a tensão resultante. É possível realizar vários testes oscilatórios aos produtos alimentares, consoante o varrimento, que pode ser realizado em tensão, frequência, tempo ou temperatura. A avaliação de um comportamento viscoelástico linear é efetuada a partir de ensaios reológicos fundamentais em regime oscilatório e em reómetros (Figura 8), usando geometrias de cilindros coaxiais, pratos paralelos ou cone e prato, de acordo com a natureza do material (Sousa, 2010).



Figura 8 – Reómetro HAAKE MARS.

Fonte: Adaptado de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/379-0340>.

Geralmente, o comportamento reológico dos produtos viscoelásticos é representado pelo módulo complexo  $G^*$  (em Pa):  $G^* = G' + i G''$ , onde  $G'$  é o módulo elástico ou de armazenamento, que corresponde à energia de deformação armazenada e o  $G''$  é o módulo viscoso ou de dissipação, que é a parte imaginária ( $i$ ) e corresponde à energia de deformação dissipada. Para determinar a zona viscoelástica linear é

utilizado o teste de varrimento de tensão, em que a tensão aplicada varia ao longo do tempo, a um valor de frequência fixo, e medem-se os módulos viscoelásticos. Determina-se a máxima tensão a aplicar no teste de varrimento de frequência, em que o material responde às solicitações sem haver destruição da sua estrutura interna. Para obter o espectro mecânico faz-se um teste de varrimento de frequências, onde se registam as variações de  $G'$  e  $G''$  em função da frequência, a uma tensão constante determinada pelo teste anterior (Sousa, 2010). Estes testes permitem avaliar a microestrutura e prever a estabilidade do sistema (Sousa, 2010).

O micro-doughLAB (Figura 9), desenvolvido pela *Perten Instruments*, é um misturador de massa em pequena escala (4g) e sistema de análise com a ação de mistura de braço para determinar a qualidade e as características de processamento da farinha e da massa. O tamanho pequeno da amostra é ideal para investigadores, manipuladores de grãos, moleiros e padeiros com amostra limitada e/ou amostras valiosas (*Perten Instruments*, 2018).



Figura 9 – Micro-doughLAB 2800.  
Fonte: Adaptado de *Perten Instruments*, 2018.

As características de uma farinha, como a quantidade de água absorvida para atingir a consistência ideal da massa, a exigência de tempo de mistura e a estabilidade da massa, são medidas importantes da sua qualidade. No Método Padrão de Teste de Farinha (01.02), a farinha é misturada com a água a temperatura constante (30°C) e velocidade de 63 rpm durante 20 minutos. A resistência à mistura é medida como torque, que é apresentado nos resultados como um gráfico de torque *versus* tempo (Figura 10). O teste padrão, para massas com glúten, visa atingir um torque máximo de 100 mNm, enquanto que para as massas sem glúten, o valor é muito inferior. As amostras podem ser avaliadas quanto à absorção ótima de água (WA), tempo de desenvolvimento da massa, estabilidade, amolecimento, índice de tolerância à amassadura entre outros parâmetros. O método é aplicável a qualquer farinha, incluindo farinha integral e formulações sem glúten (*Perten Instruments*, 2018).

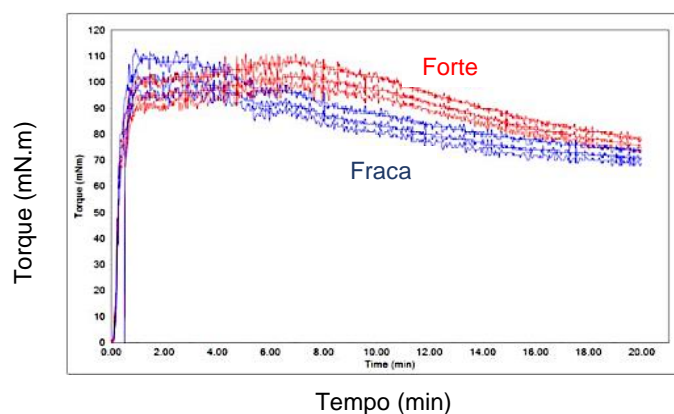


Figura 10 – Curvas do Micro-doughLAB de farinhas com glúten fortes e fracas, utilizando o método padrão, com um torque alvo de  $100 \pm 4$  mNm.

Fonte: Adaptado de *Perten Instruments*, 2018.

O método pode ser usado para triagem varietal, controlo da qualidade, para comparar amostras (duras e moles, fracas e fortes, diferentes variedades, diferentes correntes de moinhos), para avaliar a atividade de amilase na farinha, para investigar o efeito da formulação (por exemplo o efeito de açúcares adicionados, sais, emulsionantes, lipídios) e assim por diante (*Perten Instruments*, 2018).

### 1.5.3. Análise sensorial

A Análise Sensorial pode ser definida como a “disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar as reações às características de bens alimentares e de outros bens materiais tais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, sabor, tato e audição” (Alvelos, 2002); ou como o “exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos” (ISO 6658:2005). A Análise Sensorial é uma ferramenta fulcral para a indústria alimentar, visto que o consumidor atual é cada vez mais exigente e informado e dá mais importância às características sensoriais dos produtos. Por isso, no desenvolvimento de novos produtos é essencial conhecer a aceitabilidade do consumidor, pois o objetivo principal de uma empresa é vender os produtos que fabrica. A Análise Sensorial pode auxiliar, de forma direta ou indireta, as empresas do setor alimentar num vasto leque de atividades, entre as quais, a monitorização da concorrência, desenvolvimento, melhoramento e reformulação de produtos, determinação da vida útil, controlo de qualidade, aceitabilidade pelos consumidores, entre outras.

As propriedades sensoriais percebidas quando se prova um produto alimentar são o aspeto, o cheiro, a textura e o sabor. O aspeto e a cor são geralmente os primeiros atributos através dos quais se avalia a qualidade dos mesmos, pois remetem para as propriedades visíveis do produto. O cheiro é detetado quando as moléculas voláteis do



ar inspirado interagem com os recetores das células olfativas da membrana mucosa olfativa, gerando um impulso nervoso e esta informação é enviada para os nervos olfativos e destes para o cérebro. O aroma é uma característica organolética detetada pelo órgão olfativo via retro nasal, ao contrário do cheiro, cuja deteção é feita através da entrada de componentes voláteis pelo nariz. A textura corresponde ao conjunto das propriedades mecânicas, geométricas e de superfície dum produto, sendo estas cognoscíveis por recetores mecânicos, táteis e, eventualmente, por recetores visuais e auditivos (ISO 1992). O gosto corresponde à deteção, através das papilas gustativas (recetores sensoriais do paladar) situadas na superfície da língua, das sensações gustativas básicas - doce, salgado, ácido e amargo (Alvelos, 2002). Por outro lado, o sabor ou “flavor” é um atributo complexo que resulta da combinação das sensações gustativas e olfativas percebidas durante a degustação (ISO 5492:1992).

De entre os testes utilizados para avaliar sensorialmente os produtos alimentares, os mais relevantes são os testes discriminativos ou de diferenciação, testes descritivos e testes afetivos. Os testes discriminativos são usados para determinar a probabilidade de diferença ou similaridade entre produtos (ISO 6658:2005). Por sua vez, os testes descritivos envolvem a deteção, descrição e quantificação das características dos produtos por um painel de provadores treinados (Alvelos, 2002). Os testes afetivos ou hedónicos relacionam-se com a avaliação dos produtos por parte dos consumidores, sendo utilizados com o objetivo de perceber até que ponto o consumidor gosta do produto, o que prefere relativamente a outros ou o que considera aceitável do ponto de vista das suas características sensoriais (Alvelos, 2002).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para estabelecer a formulação do pão isento de glúten a utilizar como controlo, foram realizados ensaios preliminares a partir de receitas já estudadas por outros autores (Dow, 2011; Dow, 2014; Matos & Rosell, 2012; Sabanis & Tzia, 2011), que incluíam vários tipos de ingredientes. Seleccionaram-se receitas de pão branco e que envolvessem poucos ingredientes, para mimetizar as interações entre os vários constituintes da formulação. Escolheu-se a formulação controlo a partir da observação, do manuseamento e da consistência das massas e principalmente das observações sensoriais diretas dos pães.

### 2.1. Materiais

Todos os ingredientes utilizados foram seleccionados de acordo com o seu custo de mercado e garantia de isenção de glúten.

A farinha de arroz (FA) utilizada foi gentilmente cedida pelas Fábricas Lusitana (marca Espiga). O hidrocolóide hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) Wellence™ Gluten Free 321 foi cedido pela *DOW Industries* e o amido de milho Viten A pela empresa COPAM. Os restantes ingredientes – levedura desidratada (Fermipan), sal de mesa (Continente), açúcar (RAR), óleo vegetal de girassol e milho (Fula), foram adquiridos no mercado nacional.

A microalga *Chlorella vulgaris*, produzida e atomizada pela empresa portuguesa *Allmicroalgae - Natural Products*, apresenta a composição nutricional indicada na Tabela 3, com humidade de 5,5g/100g. A *Tetraselmis chuii* utilizada foi produzida à escala piloto sendo desidratada por liofilização. A sua composição nutricional (Tabela 4) foi determinada por um dos grupos de investigação do projeto Algae2Future.

Tabela 3 – Composição nutricional da alga *Chlorella vulgaris* (Fonte: Allmicroalgae – Natural Products).

<b>Composição nutricional (base seca)</b>	<b>Média (por 100g)</b>	<b>Média (por 30g)</b>	<b>% VRN* (por 3g)</b>
<b>Energia</b>	350 kcal	21 kcal	0,53%
<b>Lípidos totais dos quais:</b>	10g	0,30g	0,43%
Ácidos gordos saturados	2g	0,06g	0,30%
Ácidos gordos insaturados	1,50g	0,05g	**
Ácidos gordos polinsaturados	6g	0,18	**
<b>Hidratos de carbono dos quais:</b>	8g	0,24g	0,09%
Açúcares	0g	0g	**
Amido	0,8g	0g	**
<b>Fibra</b>	15g	0,45g	**
<b>Proteínas</b>	55g	1,65g	3,30%
<b>Sal</b>	0,35g	0,01g	0,18%
<b>Vitamina B12 (Cianocobalamina)</b>	25µg	0,75µg	30%
<b>Ferro</b>	150mg	4,5mg	32,14%
<b>ALA</b>	3g	0,09g	15%
<b>Clorofila</b>	1.800mg	54g	**
<b>Luteína</b>	850mg	25,50mg	**
<b>Carotenóides</b>	900mg	27mg	**

\* Valor de referência de nutriente.

\*\* VRN não está estabelecido.

Tabela 4 – Composição nutricional da alga *Tetraselmis chuii*.

<b>Composição nutricional</b>	<b>Média (por 100g)</b>
<b>Proteínas</b>	47,7g
<b>Lípidos</b>	11,4g
<b>EPA</b>	3,6g
<b>DHA</b>	0g
<b>Sal</b>	2,3g
<b>Amido</b>	2,4g
<b>Humidade</b>	7,5g

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Processo de fabrico do pão

Para a preparação das massas, primeiro foi feita a pesagem de 300g da mistura da farinha de arroz e do amido de milho e depois dos restantes ingredientes. De seguida, foi ativada a levedura adicionando-lhe o açúcar e a água utilizando um misturador (Bimby, Vorwerk, Alemanha), a uma temperatura de 37°C à velocidade 2 durante 2 minutos. De seguida foram adicionados os restantes ingredientes e procedeu-se à amassadura na velocidade espiga, durante 8 minutos. Posteriormente, a massa obtida foi colocada numa forma retangular (com dimensões de 25,5 x 12,0 x 6,5 cm<sup>3</sup>) e colocada numa estufa de fermentação (Unox, Itália) com temperatura controlada a 37°C, durante 45 minutos. Após a fermentação, a massa foi cozida num forno elétrico (Johnson A60) sem circulação forçada de ar, usando o tempo-temperatura determinado para cada formulação. No forno foi colocado um recipiente com água para garantir um ambiente húmido, evitando a formação precoce da crosta do pão. Posteriormente, efetuou-se o arrefecimento dos pães, num período de 2 horas, até à temperatura ambiente (cerca de 25°C), para posterior corte e análise. Por fim, os pães foram embalados em sacos de polietileno e armazenados à temperatura ambiente durante 48 horas. Todo o processo de produção está representado no fluxograma da Figura 11.

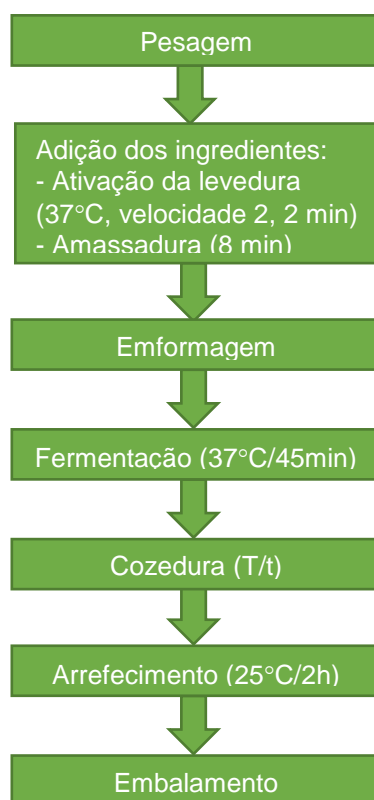


Figura 11 – Fluxograma do processo de produção do pão isento de glúten.

### 2.2.2. Seleção da receita controle – Ensaios preliminares

#### 2.2.2.1. Formulações de pães isentos de glúten

Com o objetivo de analisar as características dos pães industriais sem glúten existentes no mercado atual, utilizou-se um mix comercial como referência. Este mix comercial de referência é constituído por amido de milho, farinha de arroz, proteína de tremço, dextrose, fibra de maçã, hidroxipropilmetilcelulose e sal (Farinha Mix Pão sem Glúten, Schär).

Para o estabelecimento da formulação utilizada como controle, no presente estudo de incorporação da microalga *Chlorella vulgaris* em pão sem glúten, foram efetuados vários ensaios preliminares testando receitas usadas por vários autores em trabalhos de investigação (Tabela 5).

Tabela 5 – Formulações de pães sem glúten usados nos ensaios preliminares.

Formulações Ingredientes (%)	Ensaios preliminares			
	A	B	C	D
Farinha de arroz	33,6	33,5	44,1	12,9
Amido de milho	—	—	—	38,5
Fécula de batata	10	10	—	—
Polvilho doce	10	10	—	—
Levedura	1	1	1,3	1,0
Açúcar	2,4	2,4	1,3	1,5
Sal	0,5	0,5	0,4	0,7
HPMC	1,5	0,9	1,7	0,8
Goma Xantana	—	1	—	—
Óleo	2,6	2,6	2,6	2,1
Água	38,4	38,2	48,5	42,5
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

#### 2.2.3. Estudo do efeito das condições de processo e do teor de HPMC no pão controle

Após a seleção da formulação D como controle, foi estudada a influência do tempo de amassadura e dos diferentes tempos-temperaturas de cozedura na textura do pão. Os tempos de amassadura estudados foram 4, 8 e 12 minutos, tendo em conta os estudos já realizados pela Du Pont (2018), referentes a como o tempo de amassadura influencia o volume do pão sem glúten. Por sua vez, foram estudados os diferentes tempos-temperaturas de cozedura: 30min-160°C, 30min-170°C, 30min-200°C, 50min-

180°C, 50min-180°C e 60min-160°C (Dow, 2011; Matos & Rosell, 2012; Sabanis & Tzia, 2011).

Foram ainda realizados vários ensaios com o objetivo de analisar o efeito de diferentes teores de incorporação do espessante/gelificante hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). As proporções dos ingredientes utilizadas no desenvolvimento dessas formulações estão mencionadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Formulações dos pães controle sem glúten com diferentes teores de HPMC.

Formulações Ingredientes (%)	Controlo		
	1 % HPMC/FA+A	1,25 % HPMC/FA+A	1,5 % HPMC/FA+A
Farinha de arroz	12,9	12,9	12,9
Amido de milho	38,9	38,7	38,6
Levedura	1,0	1,0	1,0
Açúcar	1,5	1,5	1,5
Sal	0,7	0,7	0,7
HPMC	0,5	0,6	0,8
Óleo	2,1	2,1	2,1
Água	42,5	42,5	42,5
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

#### 2.2.4. Pães com incorporação de biomassa microalgal

Após a seleção da formulação controlo e das condições de processo (8 minutos de amassadura, cozedura a 60min-160°C, com 1,5% HPMC/base de farinha+amido), e considerando que esta formulação tem cerca de 78% de água, para uma base de 14% de humidade da mistura de farinha de arroz e amido de milho, utilizou-se o Micro-doughLAB para analisar a evolução das propriedades reológicas da massa durante a amassadura a 63 rpm e determinar o torque máximo.

Seguidamente, fez-se a determinação do teor de absorção de água para as massas com *Chlorella vulgaris* ou *Tetraselmis chuii* de modo a atingirem o mesmo torque do obtido para o controlo.

As formulações controlo e com incorporação de *Chlorella vulgaris* e *Tetraselmis chuii* estão mencionadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Formulações controlo e com incorporação de *Chlorella vulgaris* e *Tetraselmis chuii*.

Formulações Ingredientes	Controlo	2,5% Cv	3,75% Cv	5% Cv	5% Tc
Farinha de arroz (% mistura FA+A+Cv/Tc)	25	24,38	24,06	23,75	23,75
Amido de milho (% mistura FA+A+Cv/Tc)	75	73,12	72,19	71,25	71,25
<i>Chlorella vulgaris</i> (% mistura FA+A+Cv/Tc)	—	2,50	3,75	5	—
<i>Tetraselmis chuii</i> (% mistura FA+A+Cv/Tc)	—	—			5
Levedura (% mistura FA+A+Cv/Tc)	2	2	2	2	2
Açúcar (% mistura FA+A+Cv/Tc)	3	3	3	3	3
Sal (% em 100g mistura FA+A+Cv/Tc)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
HPMC (% em 100g mistura FA+A+Cv/Tc)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Óleo (% em 100g mistura FA+A+Cv/Tc)	4	4	4	4	4
Água (% Absorção água p/ 100g mistura FA+A+Cv/Tc)	78	78	81	85	73

### 2.2.5. Avaliação da textura da massa e do pão

A avaliação da textura foi realizada numa sala com temperatura controlada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ , num texturómetro TA.XT.plus (Stable Micro Systems, Reino Unido) equipado com uma célula de carga de 5kg. O TPA – Análise de Perfil de Textura, teste imitativo das duas dentadas consecutivas que o alimento sofre na boca, foi realizado em modo de penetrometria (sonda com dimensões inferiores à amostra) com um tempo de espera entre ciclos de 5 segundos.

Nos ensaios realizados à massa, não fermentada e após fermentação de 45min, foi utilizada uma sonda acrílica com 38mm de diâmetro (p/38) (Figura 12). Efetuaram-se pelo menos 4 repetições usando uma distância de penetração de 8 mm, à velocidade de  $1\text{ mm.s}^{-1}$ , colocando a massa em recipientes cilíndricos de  $9,5\times 6,0\text{ cm}^3$  de dimensões.

Nos testes efetuados ao pão, foi utilizada uma sonda acrílica com 10mm de diâmetro (p/10) (Figura 13). Realizaram-se pelo menos 4 repetições a uma distância de penetração de 8 mm e velocidade de  $1\text{ mm.s}^{-1}$ , em locais distintos de cada fatia de pão com 2 cm de altura.

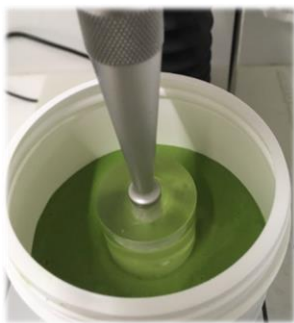


Figura 12 – Texturómetro a realizar um teste de perfil de textura (TPA) na massa com Cv, com uma sonda de 38mm Ø.



Figura 13 - Texturómetro a realizar um teste de perfil de textura (TPA) no pão controle, com uma sonda de 10mm Ø.

Foram obtidos texturogramas de força versus tempo, a partir dos quais se determinaram os seguintes parâmetros: firmeza (N), coesividade (adimensional) e adesividade (N.s).

#### 2.2.6. Análise das propriedades viscoelásticas das massas

A caracterização reológica das massas fermentadas foi feita num reómetro de tensão controlada (MARS III, Haake, Alemanha) usando o sistema sensor de pratos paralelos serrados (PP20 – 20 mm Ø) com 1 mm de distância entre pratos (Figura 14).

Após a fermentação, uma porção de massa foi colocada no prato do reómetro, tendo sido posteriormente coberta com parafina líquida para prevenir possíveis perdas por desidratação. Efetuou-se o teste de varrimento de tensão para a determinação da zona viscoelástica linear de cada material, a partir do qual se selecionou a tensão a aplicar no teste de varrimento de frequência a realizar posteriormente. Colocou-se uma nova porção de massa fermentada no prato do reómetro e realizou-se o teste de varrimento de frequência, para obter o espectro mecânico (variação do  $G'$  - módulo elástico ou de armazenamento e  $G''$  - módulo viscoso ou de dissipação com a frequência). Os testes de varrimento de tensão e frequência foram realizados a 5°C com o objetivo de cessar a fermentação. As determinações foram feitas pelo menos em triplicado.



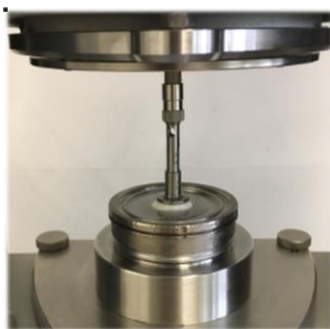


Figura 14 – Reômetro com um sistema sensor de pratos paralelos serrados a realizar um teste de varrimento de frequências à massa controlo fermentada.

Utilizou-se o Micro-doughLAB para analisar a evolução das propriedades reológicas da massa e determinar o torque máximo de todas as formulações. Pesou-se 4g da mistura de HPMC, óleo, açúcar, sal, com ou sem microalga, que posteriormente foi colocada no misturador do equipamento. Considerando uma absorção de água de 78%, o teste foi realizado a uma velocidade de 63 rpm durante 20 minutos. Obteve-se gráficos de Torque (mN.m) *versus* Tempo (min).

#### 2.2.7. Análise instrumental da cor da massa, cor do miolo e da cêdea do pão

A avaliação instrumental da cor da massa, cor do miolo e da cêdea do pão foi expressa em valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  (coordenadas do sistema CIELAB), através do Colorímetro Minolta CR – 300, Japão, com o Iluminante C. Neste sistema, as cores são descritas através da Luminosidade ( $L^*$ ) - os valores variam entre 0% (preto) e 100% (branco), e das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ . O parâmetro  $a^*$  varia entre as tonalidades vermelho (+60) e verde (-60) e  $b^*$  entre a tonalidade amarelo (+60) e azul (-60). Para cada formulação, foram efetuadas pelo menos seis repetições das quais se representa a respetiva média e desvio padrão. O colorímetro foi sempre calibrado com um padrão branco Minolta ( $L= 97,21$   $a= +0,14$ ,  $b=+1,99$ ).

#### 2.2.8. Análise da atividade da água ( $a_w$ ) do miolo do pão

As medições da atividade da água do miolo do pão foram efetuadas após o arrefecimento das amostras de pão, através do equipamento HygroPalm AW (Rotronic, Reino Unido) a temperatura constante ( $20,0\pm1^\circ\text{C}$ ). Foram efetuadas medições em triplicado para cada formulação e apresentadas as médias e o respetivo desvio padrão.

#### 2.2.9. Análise da humidade do miolo do pão

As medições da humidade do miolo do pão foram efetuadas após o arrefecimento das amostras de pão, através do equipamento ADAM PMB 202. Foram efetuadas medições em triplicado para cada formulação e apresentadas as médias e o respetivo desvio padrão.

#### 2.2.10. Volume dos pães

O volume dos pães foi medido de acordo com a norma internacional AACC 10-05.01. Esta norma fornece informações gerais sobre o método de deslocamento de sementes de colza para a medição de volume. Foi utilizada uma caixa de metal, com as dimensões 52x20x10 cm<sup>3</sup>, onde se colocou o pão e se encheu até ao topo com as sementes de colza. De seguida, mediu-se o volume das sementes que estavam na caixa de metal. Foram efetuadas medições em triplicado para cada formulação e apresentados os resultados médios. Através deste método, determinou-se o volume do pão, que se calcula subtraindo o volume das sementes necessárias para encher completamente a caixa pelo volume ocupado pelas sementes quando o pão é colocado na caixa.

#### 2.2.11. Análise Sensorial

Para a análise sensorial foram escolhidos apenas os pães incorporados com 2,5% e 3,75% (m/m farinha) de *Chlorella vulgaris* e o pão controlo, por serem à partida mais agradáveis do ponto de vista sensorial. Para avaliação dos pães quanto à aceitação sensorial foram selecionados os atributos de cor, aroma, sabor, textura, apreciação global e intenção de compra. Para tal, foi aplicada uma folha de prova (Anexo I) com uma escala de classificação hedónica para cada atributo, que varia entre “muito desagradável” e “muito agradável”, excetuando a intenção de compra que varia entre “não compraria de certeza” e “compraria de certeza”. As provas sensoriais dos pães foram realizadas numa sala de análise sensorial recorrendo a um painel de 26 provadores não treinados. Cada provador do painel foi instruído sobre a forma mais correta de realizar a análise sensorial e a importância de enxaguar a boca com água e comer uma fatia de maçã entre cada degustação. Para iniciar a prova cada pessoa recebeu as duas amostras com incorporação de alga, e só após a análise comparativa entre as duas foi dada a amostra controlo. Todas as amostras foram codificadas com duas letras e um número diferentes. Os resultados foram analisados por perfil sensorial (ISO 13299:2003) e representação gráfica (em coordenadas polares) relativamente aos atributos avaliados.

#### 2.2.12. Análise Estatística

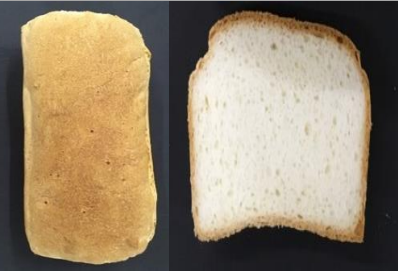


A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa estatístico *OriginPro8*. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aplicou-se o teste de Tukey para um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), com o objetivo de verificar se existem, entre os valores médios obtidos, diferenças significativas ou não significativas.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Seleção da receita controle – Ensaios preliminares

Para a seleção da formulação controle, sem glúten e com características sensoriais aceitáveis, foram efetuados vários ensaios preliminares testando receitas utilizadas por vários autores em trabalhos de investigação. Foi também preparado um pão sem glúten a partir de um mix comercial utilizado como referência. Na Tabela 8, apresentam-se as condições de processo utilizadas, as fotografias dos pães produzidos e algumas observações aos resultados obtidos com as formulações: comercial, A, B, C e D.

Tabela 8 – Resultados obtidos nos ensaios preliminares.

	Condições de processo	Fotos	Observações	Fonte
<b>Mix comercial de referência</b>	Tempo de amassadura: 8 min Tempo de fermentação: 30 min Tempo-Temperatura de cozedura: 50 min-200°C		As condições de processo são indicadas na embalagem; Aumento de volume; Boa textura	Mix comercial
<b>A</b>	Tempo de amassadura: 8 min Tempo de fermentação: 1h Tempo-Temperatura de cozedura: 60 min-180°C		Aumento de volume; difícil de cortar; miolo pouco estruturado	The Dow Chemical Company (2011)
<b>B</b>	Tempo de amassadura: 8 min Tempo de fermentação: 1h Tempo-Temperatura de cozedura: 60 min-180°C		Não aumenta de volume; crosta rija	The Dow Chemical Company (2014)

<b>C</b>	Tempo de amassadura: 8 min Tempo de fermentação: 1h Tempo-Temperatura de cozedura: 60 min-180°C		Aumento de volume	Matos & Rosell (2012)
<b>D</b>	Tempo de amassadura: 8 min Tempo de fermentação: 45 min Tempo-Temperatura de cozedura: 50 min-180°C		Aumento de volume; com alvéolos	Sabanis & Tzia (2011)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, observou-se que o pão da formulação A aumentou de volume rapidamente, devido ao elevado teor de HPMC, no entanto, não apresentou um miolo bem estruturado. Em relação à formulação B, o pão obtido era denso e pesado, possivelmente devido ao baixo teor de água e à mistura de hidrocolóides (HPMC e xantana). Contrariamente ao pão da formulação B, o pão C tem um maior teor de água e, portanto, era menos denso e com uma estrutura de miolo irregular. Verificou-se na formulação D um bom aumento de volume, alvéolos definidos e regulares, e uma boa textura de miolo. Foi selecionada a formulação D como formulação controlo, por ser a formulação que apresentou o melhor aspeto e as características sensoriais mais desejáveis para o objetivo de produção de um pão branco com uma estrutura alvéolada.

### **3.2. Estudo do efeito das condições de processo e do teor de HPMC no pão controlo**

#### **3.2.1. Estudo do efeito do tempo de amassadura e do tempo-temperatura de cozedura na textura do pão controlo**

Nas Figuras 15 e 16 estão representados os resultados da firmeza e da coesividade do pão controlo (cozedura a 60min-160°C, com 1,5% HPMC/base de FA+Amido) produzido com diferentes tempos de amassadura (4, 8 ou 12 min). Na Figura 17 apresentam-se os pães controlo com 4, 8 e 12 min de amassadura.

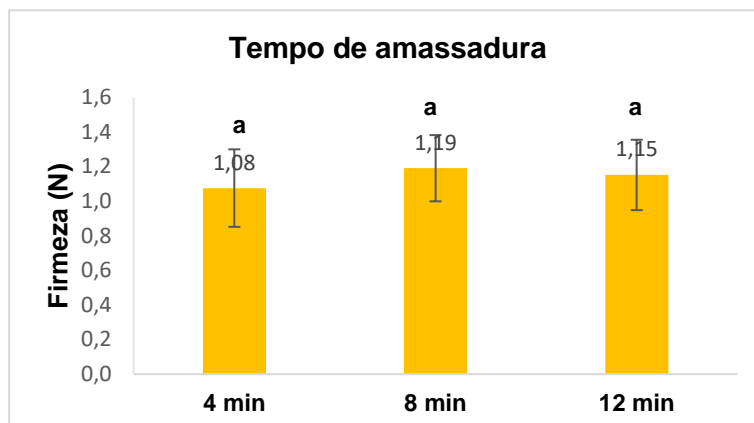


Figura 15 - Valores da firmeza do pão controlo produzido com diferentes tempos de amassadura.  
\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ).

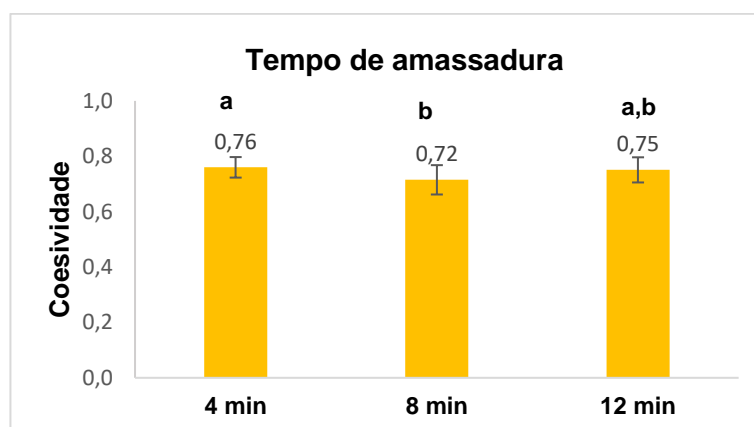


Figura 16 - Valores da coesividade do pão controlo produzido com diferentes tempos de amassadura.  
\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ).



Figura 17 – Pães controlo com 4, 8 e 12 min de amassadura (da esquerda para a direita).

Em relação aos pães com diferentes tempos de amassadura, o pão com 8 minutos de amassadura foi o que apresentou uma maior firmeza (1,19 N), muito embora os pães obtidos usando diferentes tempos de amassadura, não apresentem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores de firmeza. Em relação à coesividade, também não se verificam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os pães com 4 e 12 minutos e entre os pães com 8 e 12 minutos de amassadura.

Segundo a Du Pont (2018), os pães sem glúten necessitam de mais tempo de amassadura, cerca de 8 minutos, para incorporar o ar suficiente, para que o pão aumente de volume. Assim, foi selecionado o tempo de amassadura de 8 minutos para os estudos seguintes. Tempos mais elevados não revelaram benefícios adicionais e têm sempre associado um maior custo de produção.

Relativamente ao efeito dos diferentes tempos-temperaturas de cozedura na textura dos pães, nas Figuras 18 e 19 estão representados os resultados da firmeza e da coesividade do pão controlo (8 min de amassadura e 1,5% HPMC/base de FA+Amido). Na Figura 20 apresentam-se os pães controlo com os diferentes tempos-temperaturas de cozedura estudados.

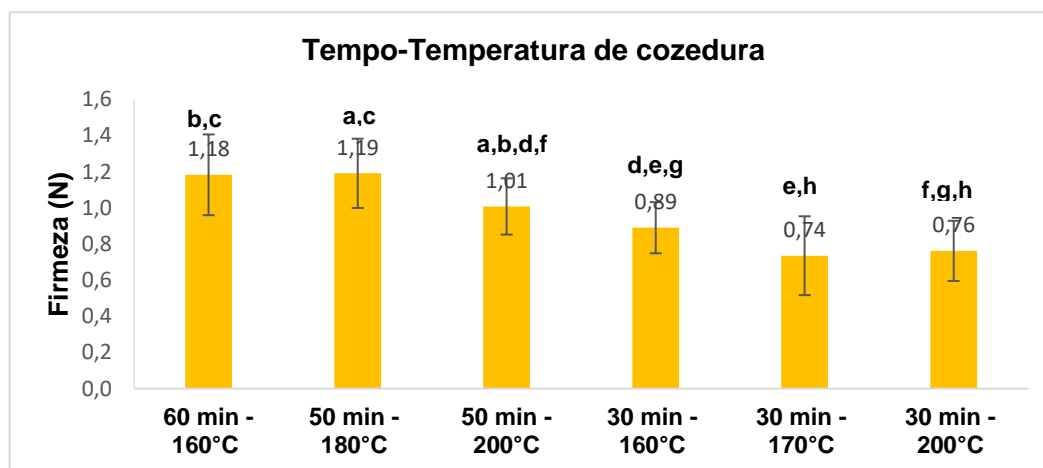


Figura 18 - Valores da firmeza do pão controlo produzido a diferentes tempos-temperaturas de cozedura.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ).

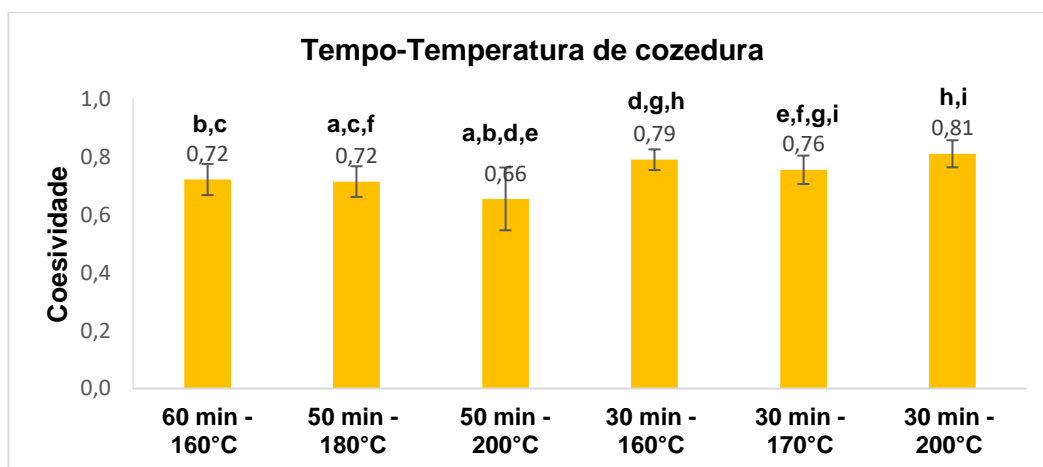


Figura 19 - Valores da coesividade do pão controlo produzido a diferentes tempos-temperaturas de cozedura.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ).

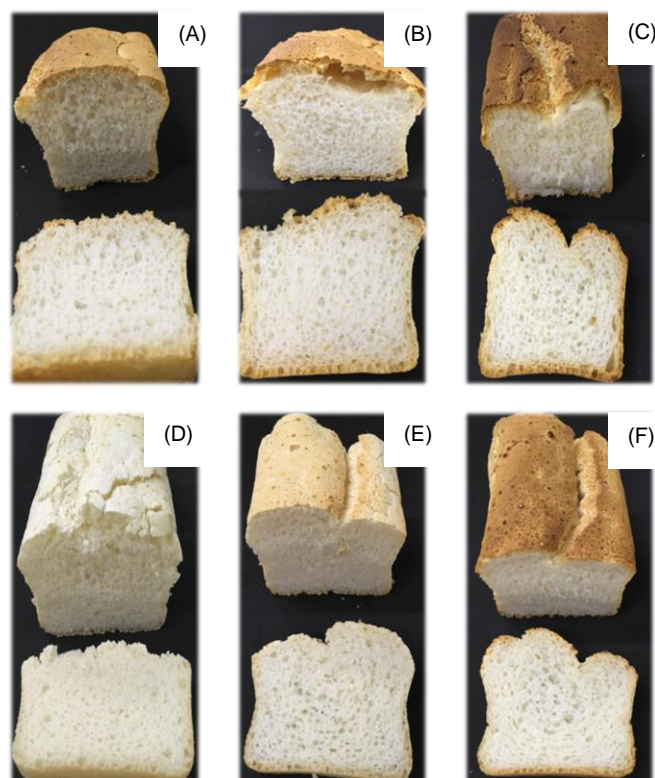


Figura 20 – Pães controle com diferentes tempos-temperaturas de cozedura: (A) 60 min–160°C; (B) 50 min–180°C; (C) 50 min–200°C; (D) 30 min–160°C; (E) 30 min –170°C; (F) 30 min–200°C.

Quanto aos diferentes tempos-temperaturas de cozedura, os pães com 60 min–160°C e 50 min–180°C apresentaram uma maior firmeza (1,18 N e 1,19 N), no entanto o tempo-temperatura de cozedura não influencia significativamente ( $p < 0,05$ ) a firmeza e a coesividade do pão.

Privilegiou-se a temperatura baixa para evitar a redução das propriedades bioativas da microalga a incorporar posteriormente, que se espera ser superior em condições de processo mais severas. Essas condições também minimizarão o processo de formação de acrilamida. Com base nestas informações, foram escolhidas as condições de cozedura durante 60 min a 160°C para o estudo seguinte.

### 3.2.2. Estudo do efeito do HPMC na textura do pão controle

Foram realizados vários ensaios preliminares com o objetivo de verificar o efeito do teor de hidrocolóide HPMC na textura do pão controle (8 min de amassadura e cozedura a 60min-160°C).

Nas Figuras 21 e 22 estão representados os resultados da firmeza e coesividade, obtidos através da Análise do Perfil de Textura (TPA), para os vários teores de HPMC estudados (1%, 1,25% e 1,5%). Na Figura 23 apresentam-se os pães controle com os vários teores de HPMC estudados.



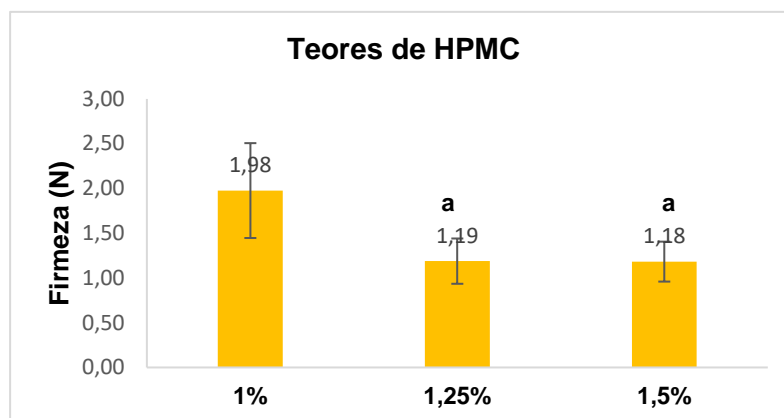


Figura 21 - Valores da firmeza do pão controlo produzido com vários teores de HPMC.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ).

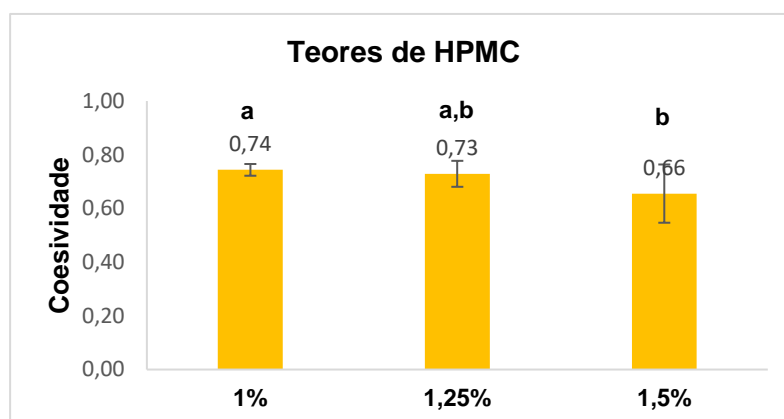


Figura 22 - Valores da coesividade do pão controlo produzido com vários teores de HPMC.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações.



Figura 23 - Pães controlo com 1%, 1,25% e 1,5% de HPMC (da esquerda para a direita).

Através da análise de variância (ANOVA), verificamos que o pão com 1% de HPMC é significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) dos pães com 1,25% e 1,5% de HPMC, relativamente à firmeza. Relativamente à coesividade não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os três pães. O aumento do teor de HPMC na mistura, conduz a uma menor firmeza do pão. Estes resultados estão de acordo com diversos estudos de outros autores, que verificaram que os hidrocolóides melhoram a estrutura

do pão, tornando o miolo mais macio (Sabanis & Tzia, 2011). O HPMC é um ingrediente importante para a produção de pão sem glúten devido à sua capacidade de imitar as propriedades de viscoelasticidade do glúten. Este hidrocolóide reduz o endurecimento, melhora a ligação da água e a estrutura geral do pão resultante (Ngemakwe, PH., *et al.*, 2014). Com base nos resultados de textura e das características sensoriais dos pães obtidos, selecionou-se a concentração de HPMC de 1,5% (em relação à FA+Amido).

### 3.3. Incorporação de biomassa microalgal em formulações de pão sem glúten

#### 3.3.1. Determinação do teor de absorção de água das formulações

Na Figura 24 e na Tabela 9 apresentam-se as curvas obtidas no Micro-doughLAB e os resultados dos torques obtidos a 63 rpm para as massas com diferentes níveis de incorporação de microalga usando 78% de absorção de água (WA).

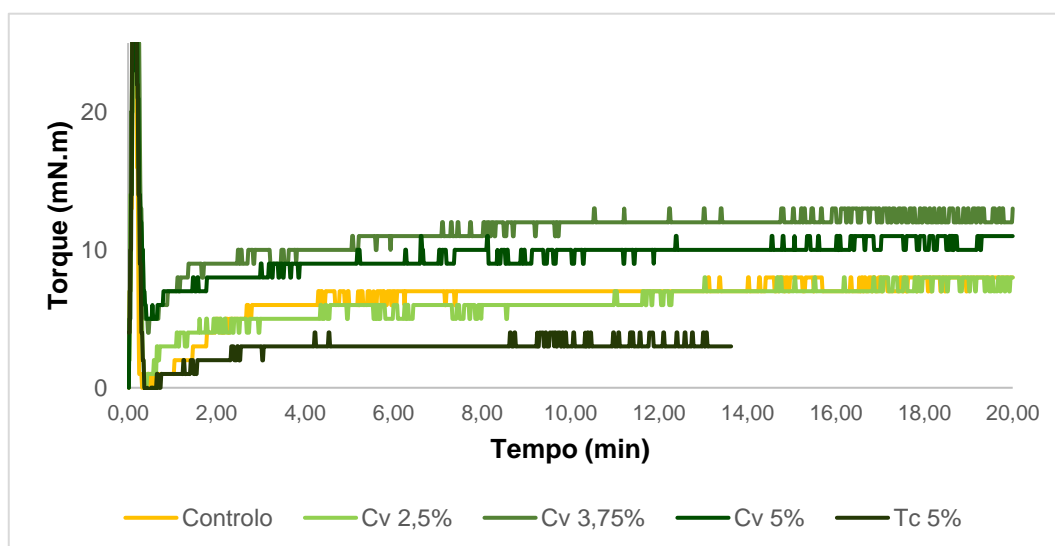


Figura 24 - Curvas do Micro-doughLAB de todas as formulações para uma absorção de água de 78%.

Tabela 9 – Torque final obtido para todas as formulações usando uma absorção de água de 78%.

Torque (mN.m)	
<b>Controlo</b>	7
<b>2,5% Cv</b>	7
<b>3,75% Cv</b>	11
<b>5% Cv</b>	10
<b>5% Tc</b>	3

Através da Figura 24 e da Tabela 9, verifica-se que a 78% de absorção de água os torques obtidos para a formulação controlo e para a formulação com incorporação de 2,5% de Cv são muito semelhantes, aproximadamente, 7 mN.m. No entanto, verificou-se para as restantes formulações um aumento do valor do torque, correspondente a uma massa mais consistente, pelo que se ajustou o teor de absorção de água (WA).

Fez-se a determinação do teor de absorção de água (Tabela 10) para as massas com *Chlorella vulgaris* ou *Tetraselmis chuii* de modo a atingirem o mesmo torque do obtido para o controlo, isto é, 7 mN.m.

Na Figura 25 e na Tabela 10 apresentam-se as curvas obtidas no Micro-doughLAB e resultados dos torques finais para as formulações finais.

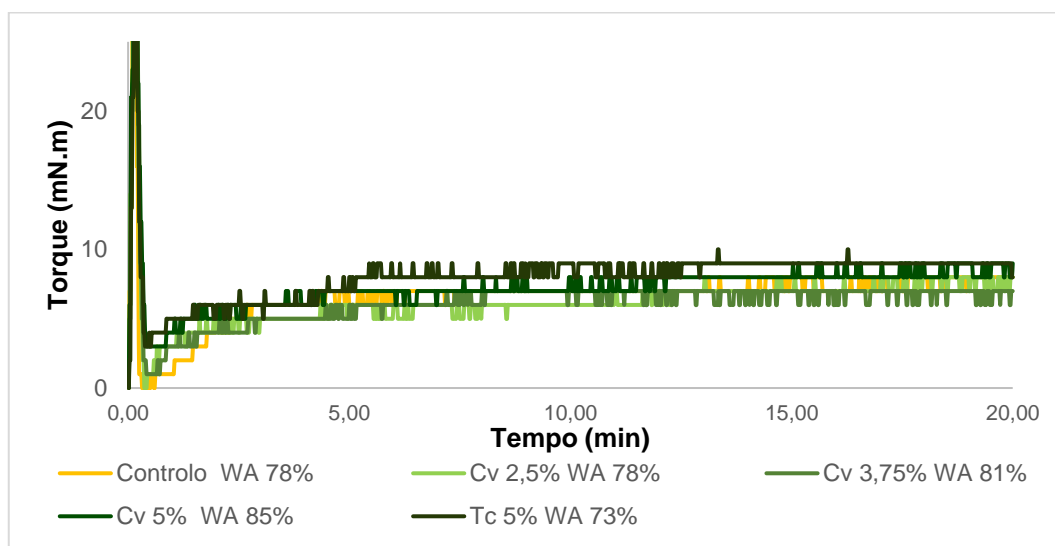


Figura 25 - Curvas do Micro-doughLAB de todas as formulações finais.

Tabela 10 - Valores obtidos para o teor absorção de água a usar nas várias formulações (torque final= 7 mN.m).

Absorção de água	
<b>Controlo</b>	78%
<b>2,5% Cv</b>	78%
<b>3,75% Cv</b>	81%
<b>5% Cv</b>	85%
<b>5% Tc</b>	73%

O aumento da absorção de água (Tabela 10) das formulações incorporadas com Cv (3,75% e 5%) estará relacionado com presença extra de proteína proveniente da microalga (Graça *et al.*, 2018), verificando-se que um maior teor de microalga, resulta

num maior teor de absorção de água. Isto sugere que as células da Cv, necessitaram de mais água para atingir a consistência desejada. Resultados semelhantes foram observados por Mohammed *et al.* (2012), com adição de proteínas de leguminosas à farinha de trigo, e observados por Graça *et al.* (2018) com adição da microalga *C. vulgaris* no pão de trigo. O aumento da absorção de água é resultante da incorporação de proteínas vegetais ou outras fontes de proteína (concentrados ou isolados) à farinha de trigo e tem sido atribuído à capacidade de absorção de água dessas proteínas e à sua capacidade de competir pela água com outros constituintes no sistema da massa, resultando em massas que exibem maior absorção de água (Graça *et al.*, 2018).

As massas com diferentes concentrações de Cv (2,5%, 3,75% e 5%) e Tc 5% foram preparadas nas etapas seguintes do trabalho utilizando os valores de absorção de água das análises no Microdough-LAB (Tabela 10).

### 3.3.2. Avaliação da textura da massa

Na Figura 26 apresentam-se os resultados de firmeza, obtidos a partir do TPA, das massas sem glúten estudadas - mix comercial, controlo e das massas com diferentes níveis de incorporação de *Chlorella vulgaris* (Cv) – 2,5%, 3,75% e 5%.

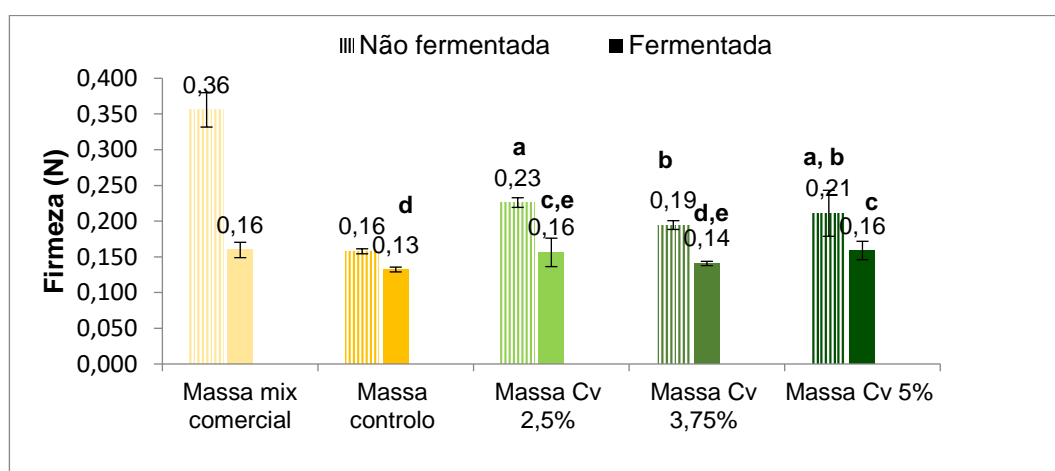


Figura 26 – Valores da firmeza da massa não fermentada e fermentada, preparada com diferentes níveis de incorporação de *Chlorella vulgaris*.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ). O mix comercial não foi considerado na ANOVA.

No mix comercial, observa-se que a massa não fermentada tem uma firmeza muito elevada (0,36 N), mas após a fermentação, os valores da firmeza diminuem (0,16 N) para valores idênticos ao controlo e aos das massas com incorporação de Cv.

No caso da massa não fermentada, verifica-se que a adição de Cv (2,5%, 3,75%, 5%) aumenta a firmeza da massa em relação ao controlo, mas os valores de firmeza entre as concentrações de Cv estudadas são idênticas, isto é, não se verifica diferenças

significativas entre as mesmas ( $p < 0,05$ ). Este facto pode ser explicado pelo estudo de Batista *et al.* (2017), sobre a incorporação de microalgas em bolachas de trigo, que mostra que é possível que, ao serem adicionadas à massa, as microalgas absorvam mais água e gordura, reforçando a estrutura interna do produto. A massa não fermentada com maior firmeza é a incorporada com 2,5% de Cv (0,23 N), enquanto que a massa com menor firmeza é a com 3,75% de Cv (0,19 N).

Na massa fermentada, não há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a massa controlo e a massa com 3,75% de Cv e verifica-se que diferentes níveis de incorporação e biomassa microalgal têm um impacto reduzido nos valores de firmeza da massa. A massa fermentada com maior firmeza é a incorporada com 2,5% de Cv (0,16 N), enquanto que a massa com menor firmeza é a com 3,75% de Cv (0,14 N).

Na Figura 27 apresentam-se os resultados da adesividade das massas, obtidos a partir do teste de TPA.

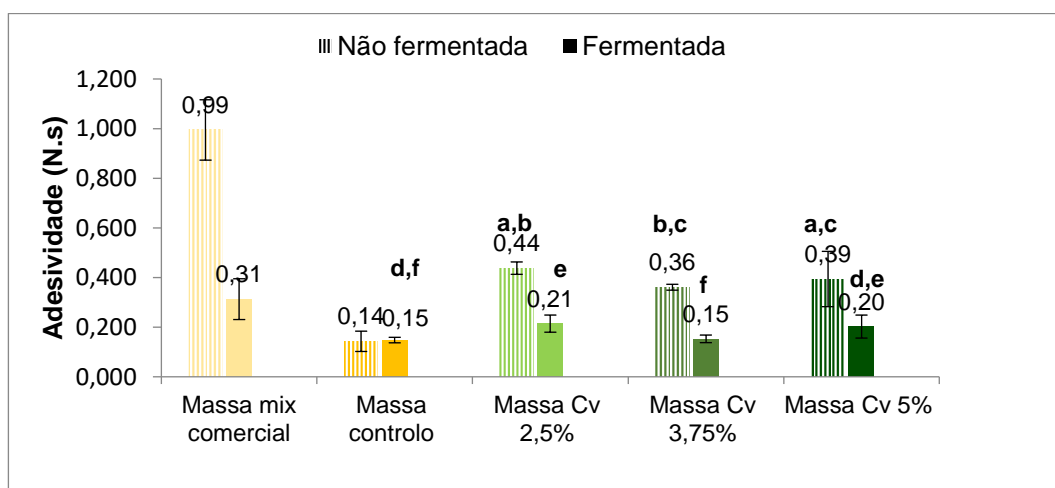


Figura 27 – Valores da adesividade da massa não fermentada e fermentada, preparada com diferentes níveis de incorporação de *Chlorella vulgaris*.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ), de acordo com a ANOVA. O mix comercial não foi considerado na ANOVA.

Constata-se, no mix comercial, que a massa não fermentada tem uma adesividade muito elevada (0,99 N.s), mas após a fermentação, os valores da adesividade diminuem (0,31 N.s) para valores mais próximos dos obtidos para o controlo e para as massas com incorporação de *Chlorella vulgaris*. No caso da massa não fermentada, verifica-se que a adição de Cv (2,5%, 3,75%, 5%) aumenta a adesividade da massa em relação ao controlo (0,14 N.s), mas os valores de adesividade entre as concentrações de Cv estudadas são idênticas, isto é, não se verifica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as mesmas.

Na massa fermentada, não há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a adesividade da massa controlo (0,15 N.s) e a da massa com 3,75% (0,15 N.s) e 5%

(0,20 N.s) de Cv, no entanto, há diferenças significativas entre a massa com 3,75% de Cv e as massas com 2,5% (0,21 N.s) e 5% de Cv. A massa fermentada com maior adesividade é a incorporada com 2,5% de Cv (0,21 N.s), enquanto que a massa com menor adesividade é a com 3,75% de Cv (0,15 N.s).

Na Figura 28 estão apresentados os resultados da coesividade, calculados a partir do TPA, das mesmas massas.

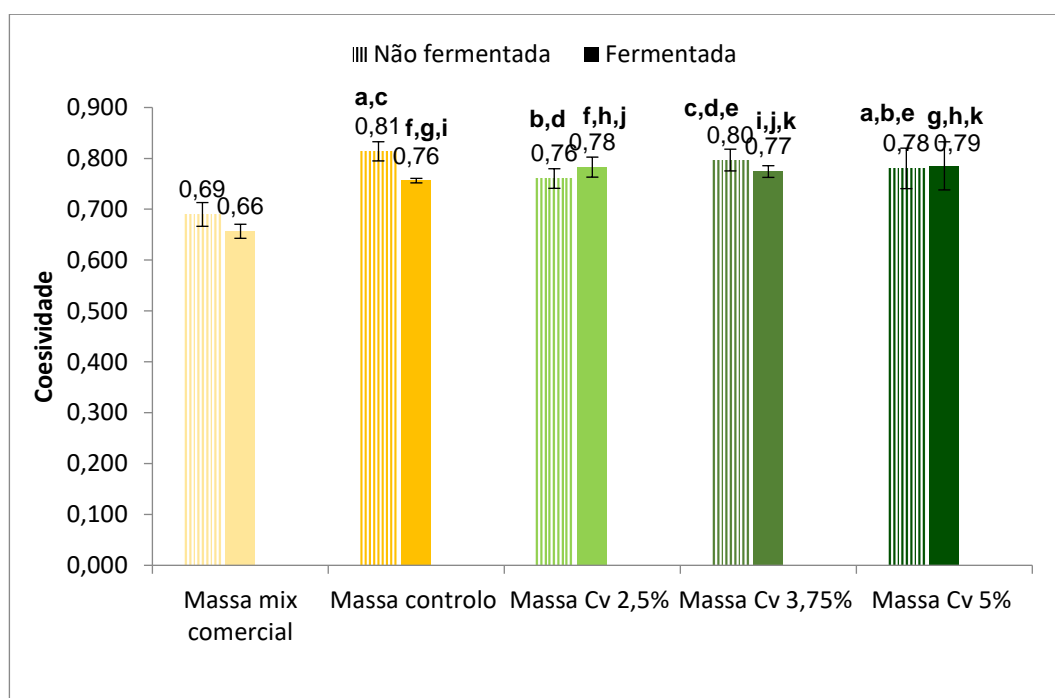


Figura 28 – Valores da coesividade da massa não fermentada e fermentada, preparada com diferentes níveis de incorporação de *Chlorella vulgaris*.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ). O mix comercial não foi considerado na ANOVA.

Verifica-se que a massa do mix comercial apresenta, em comparação com as restantes formulações, uma menor coesividade (0,69 e 0,66). Tanto na massa não fermentada como na fermentada, não se verificam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a formulação controlo e as formulações com incorporação de Cv, concluindo-se que diferentes níveis de incorporação de biomassa microalgal têm um impacto reduzido nos valores de coesividade da massa (Figura 28).

Na Figura 29 apresentam-se as massas estudadas com diferentes incorporações de Cv e comparação com a massa controlo e o mix comercial.

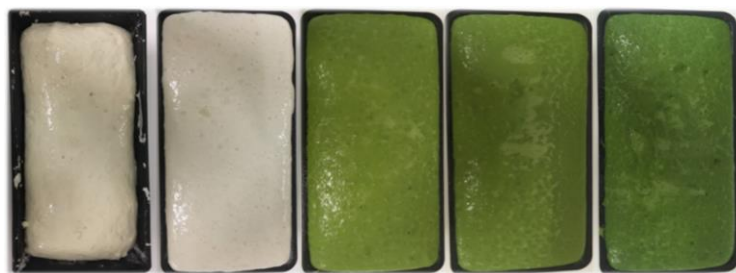


Figura 29 - Massas fermentadas mix comercial, controle, Cv 2,5%, Cv 3,75%, Cv 5% (da esquerda para a direita).

### 3.3.3. Análise das propriedades viscoelásticas da massa

A Figura 30 apresenta os resultados obtidos nos testes de varrimento de frequência efetuados às massas fermentadas da formulação controle e das formulações incorporadas com 2,5%, 3,75% e 5% de *C. vulgaris*.

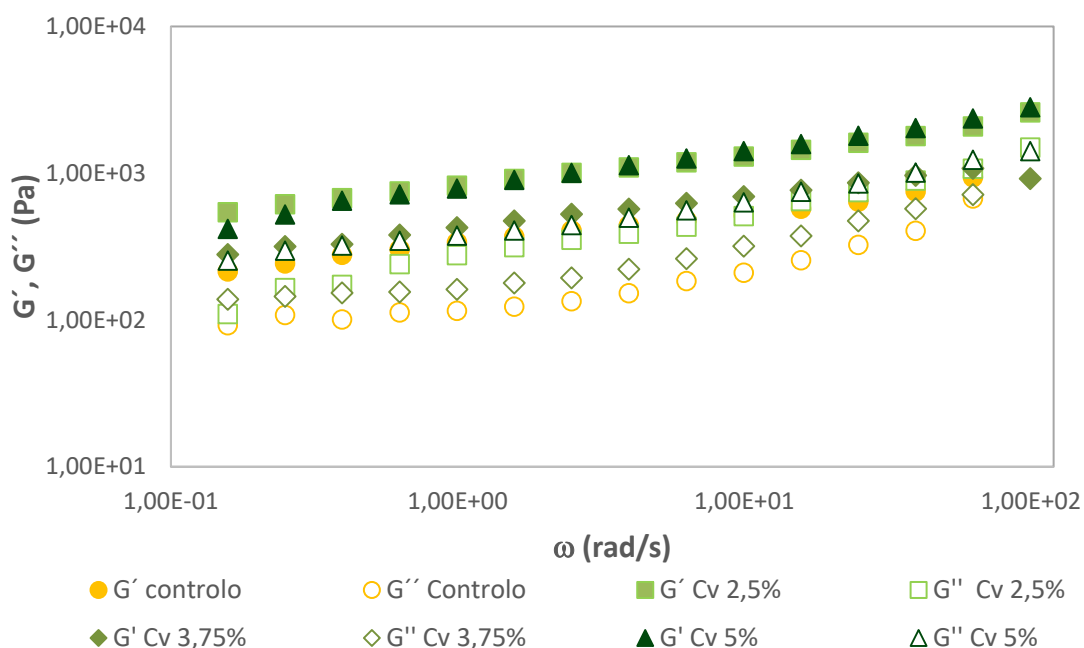


Figura 30 – Espectros mecânicos a 5°C, das massas fermentadas a 37°C, com diferentes teores de Cv e comparação com o controle (sem microalga).

Analisando os espectros mecânicos da Figura 30 verifica-se que todas as massas possuem uma componente elástica ( $G'$ ) superior à componente viscosa ( $G''$ ), demonstrando um comportamento predominantemente elástico, embora os valores dos módulos sejam reduzidos. Foi observado em diversos estudos que o hidrocolóide HPMC aumenta o módulo elástico ( $G'$ ) dos pães sem glúten (Mancebo *et al.*, 2015). Constata-se também que a diferença de valores entre os módulos  $G'$  e  $G''$  são inferiores a uma

década, demonstrando tratarem-se de massas com um comportamento aproximado a um gel fraco.

O teste de varrimento de frequência foi realizado para avaliar o impacto da adição da microalga Cv na estrutura da massa fermentada. Os espectros mecânicos apresentados na Figura 30 mostram que as massas com 2,5% Cv e 5% Cv têm maiores valores de  $G'$ , em relação à massa com 3,75% Cv e à controlo. Tal como Graça *et al.* (2018) sugeriu para a massa de farinha de trigo e Cv, os maiores valores de  $G'$  serão indicativos de um efeito fortalecedor da estrutura da massa, provavelmente devido a um reforço da matriz proteica, resultante da adição da microalga com um conteúdo elevado de proteína.

A dependência de  $G'$  (módulo elástico) e  $G''$  (módulo viscoso) da frequência pode ser descrita pela equação da lei de potência:

$$G' = \alpha' f^{b'}$$

Equação 1

$$G'' = \alpha'' f^{b''}$$

Equação 2

Os valores de  $\alpha$  e  $b$  são determinados através da regressão linear do logaritmo  $G'$  e  $G''$  *versus* o logaritmo da frequência, onde  $\alpha'$  e  $\alpha''$  são as ordenadas na origem e  $b'$  e  $b''$  são os declives (Bernaerts *et al.*, 2017). Os valores obtidos para estes parâmetros são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Ajuste das Equações 1 e 2 aos espectros mecânicos das massas com diferentes teores de Cv e comparação com o controlo (sem microalga).

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ).

	$\alpha'$	$b'$	$\alpha''$	$b''$
<b>Controlo</b>	299,8 a	0,284 d,e,g	123,5 j,k	0,314 n,o,q
<b>Cv 2,5%</b>	682,4 b,c	0,243 d,f,h	254,9 j,l,m	0,295 n,p,r
<b>Cv 3,75%</b>	374,9 a,b	0,287 e,f,i	167,7 k,l	0,327 o,p,s
<b>Cv 5%</b>	785,9 c	0,275 g,h,i	399,4 m	0,214 q,r,s

O coeficiente de determinação  $R^2$  dos ajustes anteriores situa-se entre 0,844 e 0,996.

De acordo com os valores de  $b'$  e  $b''$  todas as formulações apresentam uma dependência da frequência semelhante. Verificou-se que os valores de  $\alpha'$  e  $\alpha''$  aumentaram com a incorporação de Cv, contudo, não há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a formulação controlo e a formulação com 3,75% de Cv. Assim, concluiu-



se que a estrutura interna da massa foi reforçada com a incorporação da microalga, em concordância com os valores de firmeza da massa não fermentada e fermentada obtidos a partir do TPA.

#### 3.3.4. Avaliação da textura do pão

Para os pães obtidos, foi efetuada a Análise de Perfil de Textura (TPA) das seguintes formulações: mix comercial, controlo, e pães com incorporação de *Chlorella vulgaris* (Cv) 2,5%, 3,75% e 5%. Foi ainda preparado o pão com incorporação de 5% de *Tetraselmis chuii* (Tc), para efeitos comparativos, pois trata-se de outra microalga com elevado potencial para incorporação neste tipo de produtos.

Na Figura 31 são apresentados os valores de firmeza das formulações mencionadas anteriormente.

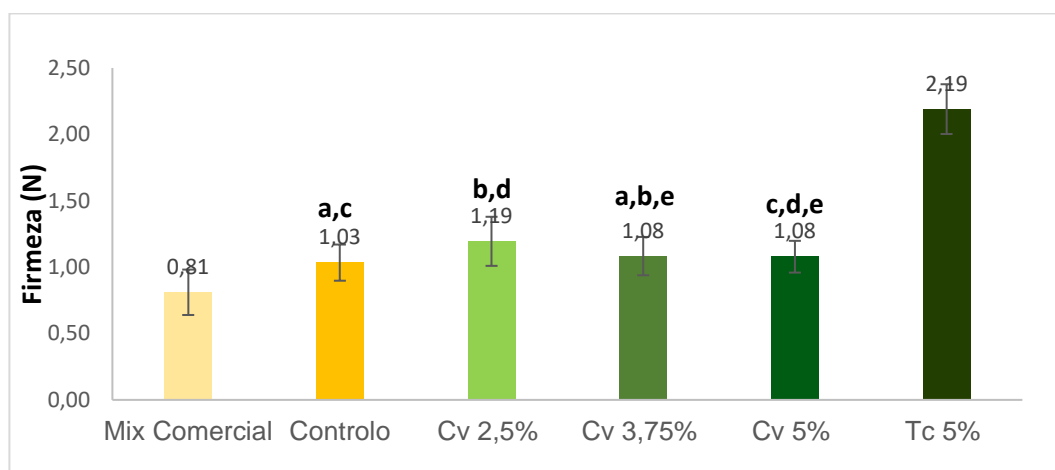


Figura 31 – Valores da firmeza, obtidos por TPA, dos pães com diferentes níveis de incorporação de Cv, do controlo (sem microalga) e do pão comercial.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ). O mix comercial e o pão com Tc não foram considerados na ANOVA.

Como se constata analisando a Figura 31, o pão controlo (1,03 N) apresenta uma firmeza superior ao do mix comercial (0,81 N). No entanto, é inferior às das formulações com incorporação de *C. vulgaris* (1,19 N, 1,08 N, 1,08 N, respetivamente para 2,5%, 3,75% e 5%). Assim, a incorporação de *C. vulgaris* aumenta a firmeza do pão, contudo, as diferenças de firmeza entre a formulação controlo e as formulações com *C. vulgaris* não são significativas ( $p < 0,05$ ). O aumento de firmeza com a incorporação da microalga é corroborado por Gouveia *et al.* (2007) no estudo sobre a utilização de biomassa de *Chlorella vulgaris* como fonte de coloração em bolachas com glúten. Este aumento mostra o efeito positivo da microalga na proteção da estrutura do pão, e pode ser explicado pelo elevado teor de proteína da Cv (55 g). As moléculas de

proteína e hidratos de carbono da microalga também podem desempenhar um papel importante no processo de absorção de água, o que promove o aumento da firmeza dos pães, como foi observado por Piteira *et al.* (2004).

Comparando os pães com 5% de Cv e Tc, verifica-se que o pão com 5% de Tc é o que apresenta uma maior firmeza (2,19 N vs 1,08 N), embora as diferenças no teor de proteína destas duas algas não sejam relevantes (Tabelas 3 e 4). Esta diferença pode dever-se ao pré-tratamento que amostra de Tc sofreu antes da liofilização, utilizando um moinho de esferas, conseguindo-se cerca de 90% de células com disrupção da parede celular. A amostra de Cv foi desidratada por atomização (*spray-drying*) e, por isso, deverá ter um menor nível de disrupção celular. Assim, durante o tratamento térmico subsequente da biomassa microalgal, durante o processo de cozedura, deverá haver uma maior saída dos constituintes celulares no caso da *Tetraselmis chuii* (Tc), nomeadamente proteína e hidratos de carbono, que contribuem para o reforço da estrutura final do pão. De salientar que esta alga foi usada neste trabalho apenas numa fase final, para efeito de comparação com a *Chlorella vulgaris* (Cv), não tendo sido possível estudar o seu efeito nas propriedades de textura e reologia da massa.

A Figura 32 representa a coesividade do pão obtido a partir das formulações mencionadas anteriormente.

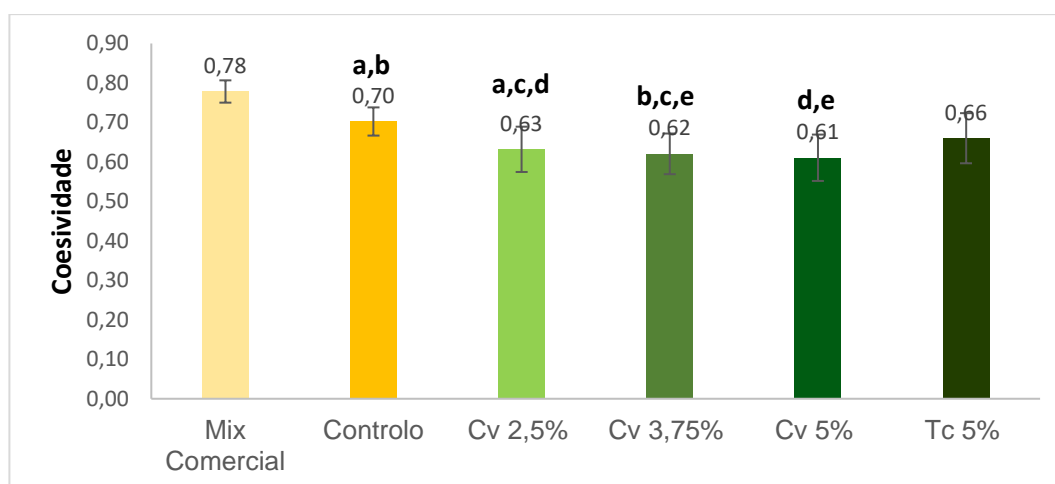


Figura 32 – Valores da coesividade, obtidos por TPA, dos pães com diferentes níveis de incorporação de Cv, do controlo (sem microalga) e do pão comercial.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ). O mix comercial e o pão com Tc não foram considerados na ANOVA.

Constata-se que o pão preparado com o mix comercial é o que apresenta uma maior coesividade (0,78) e que o pão controlo apresenta uma maior coesividade (0,70) do que os pães com incorporação de Cv, e ainda que há um decréscimo dos valores de

coesividade com o aumento do teor de Cv. Contudo, as diferenças da coesividade entre a formulação controlo e as formulações com *C. vulgaris* não são significativas ( $p < 0,05$ ). O pão com 5% de Tc apresenta, por um lado, uma menor coesividade (0,66) do que o pão controlo, mas por outro lado, uma maior coesividade do que os pães incorporados com Cv.

Na Figura 33 apresentam-se os pães estudados com diferentes incorporações de Cv e comparação com o pão controlo e o mix comercial.



Figura 33 – Pães mix comercial, controlo, Cv 2,5%, Cv 3,75%, Cv 5% e Tc 5% (da esquerda para a direita).

### 3.3.5. Evolução da textura do pão ao longo do armazenamento

Na Figura 34 está representado a evolução dos valores de firmeza, ao longo do armazenamento dos pães com incorporação de Cv e comparação com o pão controlo e com o mix comercial, durante 48h à temperatura ambiente.

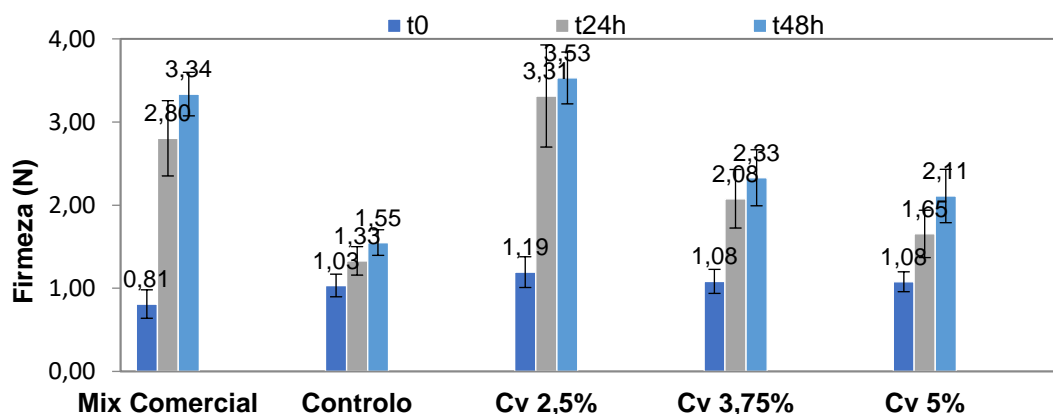


Figura 34 – Evolução da firmeza dos pães com incorporação de Cv, ao longo do armazenamento durante 48h à temperatura ambiente e comparação com o controlo e com o mix comercial.

Como referido anteriormente (Figura 31), no tempo zero, isto é, cerca de 2 h após a cozedura para arrefecimento do pão até à temperatura ambiente, o pão incorporado com 2,5% de Cv é o que apresenta uma maior firmeza, enquanto que o pão obtido com o mix comercial é o que apresenta uma menor firmeza. Verifica-se que o

pão com 2,5% de Cv apresenta um maior acréscimo de firmeza após 24 h (1,19 N para 3,31 N) e após 48 h (3,31 N para 3,53 N), comparativamente com os restantes. De uma forma geral, constata-se que a variação da firmeza, foi superior no período entre as 0 e 24 h comparativamente à variação entre as 24 e 48 h.

Realizando a ANOVA aos resultados de firmeza de todos os pães, após 24h de armazenamento, exceto para o pão obtido com o mix comercial, concluiu-se que o pão controlo é significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) do pão com Cv 2,5%, e que o pão com Cv 2,5% é significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) dos pães com Cv 3,75% e 5%. No tempo 48h, apenas os pães com Cv 3,75% e Cv 5% não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A firmeza do pão controlo no tempo zero (1,03 N) é significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) à do tempo 48h (1,55 N). No caso dos pães com Cv 2,5% e Cv 3,75%, há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as firmezas no tempo 0h e 24h e entre as firmezas no tempo 0h e 48h. Enquanto que no pão com Cv 5%, a firmeza é significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) nos tempos 0h, 24h e 48h.

De acordo com alguns estudos, o amido está significativamente envolvido no processo de envelhecimento do pão, isto é, o aumento de firmeza do miolo está relacionado com a retrogradação do amido (Gary & Bemiller, 2003). Quando os grânulos de amido são aquecidos, os grânulos incham e parte da amilose difunde-se dos grânulos, concentrando-se na água intersticial entre os grânulos. A pequena quantidade de amilose que sai dos grânulos durante a cozedura, sofre retrogradação após o arrefecimento, isto é, ocorre um processo de cristalização pela forte tendência à formação de pontes de hidrogénio (Gary & Bemiller, 2003).

Estes estudos também mostram que há outros fatores que participam no processo de envelhecimento do pão, como a humidade. A taxa de firmeza do pão também depende do teor de humidade do pão (Rogers *et al.*, 1988). Existe uma relação inversa entre o teor de humidade e a taxa de endurecimento, por outro lado, a taxa de retrogradação de amido no pão é diretamente proporcional ao teor de humidade (Gary & Bemiller, 2003). Esta conclusão, explica o facto de o pão com Cv 2,5% apresentar um maior acréscimo de firmeza após 24 e 48 h, visto que é o pão com o menor teor de humidade (44,42%) (Tabela 14). Contrastando com o pão com Cv 5%, que apresenta o maior teor de humidade (47,23%) (Tabela 14), entre os pães incorporados com alga e, portanto, um menor acréscimo de firmeza após 24 e 48 h.

### 3.3.6. Cor da massa e cor do miolo e da cdea do po

Na Tabela 12 resumem-se os valores dos parmetros resultantes da avaliao instrumental da cor - L\* e das coordenadas cromticas a\* e b\*, obtidos para as massas no fermentadas das seguintes formulaes: mix comercial, controlo e com incorporao de 2,5%, 3,75% e 5% de Cv.

Tabela 12 - Valores do parmetro L\* e das coordenadas cromticas a\* e b\* das massas no fermentadas.

\* Letras iguais correspondem a valores no significativamente diferentes entre as formulaes (p<0,05).

	L* (%)	a*	b*	$\Delta E$ (comparao com o controlo)	$\Delta E$ (comparao com a linha anterior)
<b>Massa Mix Comercial</b>	86,08 $\pm$ 0,08	(-1,32) $\pm$ 0,10	12,34 $\pm$ 0,15	-	-
<b>Massa controlo</b>	84,93 $\pm$ 2,86	(-0,83) $\pm$ 0,13	8,62 $\pm$ 0,20	-	-
<b>Massa Cv 2,5%</b>	58,47 $\pm$ 0,28	(-17,67) $\pm$ 0,42	31,54 $\pm$ 1,20 <b>a,b</b>	38,8	-
<b>Massa Cv 3,75%</b>	53,45 $\pm$ 0,13	(-18,27) $\pm$ 0,06	32,49 $\pm$ 0,30 <b>a,c</b>	43,2	5,1
<b>Massa Cv 5%</b>	48,50 $\pm$ 0,05	(-19,14) $\pm$ 0,12	32,26 $\pm$ 0,41 <b>b,c</b>	47,1	5,0

Na Figura 35 apresentam-se as massas no fermentadas com diferentes incorporaes de Cv e comparao com a massa no fermentada controlo e o mix comercial.



Figura 35 – Massas no fermentadas: Mix comercial; Controlo; Cv 2,5%; Cv 3,75%; Cv 5%.

Em geral, os valores de L\* mais elevados, indicam uma massa com uma colorao mais clara. Em relao aos parmetros de cromaticidade (a\* e b\*), foi possvel verificar que todas as formulaes se apresentaram numa localizao no espao de cor nas regies do verde e do amarelo, que correspondem a valores negativos para a coordenada a\* e positivos para a coordenada b\*.

Verifica-se que em relao  luminosidade (L\*) e ao parmetro de cromaticidade (a\*), todas as formulaes de massa foram significativamente diferentes (p<0,05). Por outro lado, em relao ao parmetro de cromaticidade (b\*) as formulaes com incorporao de Cv no so significativamente diferentes entre elas (p<0,05). A massa do mix comercial apresentou um valor mdio de L\* de 86,08%, significativamente (p<0,05) superior ao obtido para as massas com incorporao de Cv, tal como a

formulação controlo (84,93%). Para saber o impacto da incorporação de Cv na cor das massas, calculou-se a diferença total de cor ( $\Delta E$ ) entre a amostra controlo e as amostras com Cv, com base na variação entre os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad \text{Equação 3}$$

Verificou-se uma maior diferença de cor entre a massa controlo e a massa com 5% de Cv, sendo esta a mais escura e mais verde. Também se calculou a diferença de cor entre cada massa com Cv e a anterior com menor incorporação de microalga, com o objetivo de saber se o olho humano consegue detetar as diferenças de cor entre as três formulações estudadas. Sob condições controladas, um valor de  $\Delta E$  maior ou igual a 1 pode ser detetado pelo olho humano. No entanto, sob condições clínicas,  $\Delta E$  tem de se aproximar de um valor igual ou superior a 3,3 para que o olho humano possa detetar uma cor diferente (Odaira, 2011). Visto que os valores obtidos foram cerca de 5, o olho humano consegue detetar as diferenças de cor entre as três formulações com *Chlorella vulgaris* mas com dificuldade, pois o valor é baixo e próximo de 3,3.

Na tabela 13 resumem-se os valores obtidos para os parâmetros de cor – luminosidade  $L^*$  e das coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$  do miolo e còdea dos pães.

Tabela 13 - Valores do parâmetro  $L^*$  e das coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$  e do parâmetro  $\Delta E$  do miolo e da còdea do pão com diferentes níveis de incorporação de microalga.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ).

Miolo	$L^*$ (%)	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$ (comparação com o controlo)	$\Delta E$ (comparação com a linha anterior)
Pão Mix Comercial	77,79 ± 1,56	(-1,99) ± 0,14	11,02 ± 0,71	-	-
Pão controlo	62,86 ± 3,00	(-1,84) ± 0,26	7,98 ± 0,99	-	-
Pão Cv 2,5%	35,46 ± 3,88	(-3,66) ± 0,40	25,32 ± 1,96 e	32,5	-
Pão Cv 3,75%	30,45 ± 1,46 a	(-3,10) ± 0,19 c	23,00 ± 0,63 e	35,7	5,5
Pão Cv 5%	27,37 ± 2,50 a	(-2,73) ± 0,21 c	19,51 ± 2,30	37,3	4,7

Còdea	$L^*$ (%)	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$ (comparação com o controlo)	$\Delta E$ (comparação com a linha anterior)
Pão Mix Comercial	47,56 ± 2,52	10,94 ± 1,21	22,80 ± 1,94	-	-
Pão controlo	68,71 ± 2,01	7,61 ± 1,33	36,70 ± 2,77	-	-
Pão Cv 2,5%	42,93 ± 2,02 b	1,79 ± 1,09	24,34 ± 1,47 f	29,2	-
Pão Cv 3,75%	43,81 ± 2,02 b	(-0,17) ± 0,56 d	23,95 ± 0,93 f	29,0	2,2
Pão Cv 5%	34,28 ± 2,98	(-1,00) ± 1,71 d	17,88 ± 1,53	40,2	11,3

Relativamente ao miolo do pão (Figura 36), verifica-se que a luminosidade ( $L^*$ ) e a tonalidade verde ( $a^*$ ) das formulações do pão com Cv 3,75% e Cv 5% não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, em relação à tonalidade amarela  $b^*$ , as formulações com Cv 2,5% e 3,75% não são significativamente diferentes entre elas ( $p < 0,05$ ). O miolo do mix comercial apresentou um valor médio de  $L^*$  de 77,79%, significativamente ( $p < 0,05$ ) superior ao obtido para os pães com incorporação de Cv. Em geral, os valores de  $L^*$  mais elevados, indicam um miolo com uma coloração mais clara. Em relação à total diferença de cor ( $\Delta E$ ) entre a amostra controlo e as amostras com Cv, verifica-se uma maior diferença entre o miolo do controlo e o miolo com 5% de Cv, sendo este o mais escuro. Relativamente à diferença de cor entre cada pão com Cv e o anterior com menor teor de microalga, os valores obtidos foram próximos de 5, por isso, o olho humano consegue detetar a diferença de cor mas com dificuldade (Odaira, 2011).



Figura 36 - Miolo dos pães: Mix comercial; Controlo; Cv 2,5%; Cv 3,75%; Cv 5%.

No caso da còdea do pão (Figura 37), verifica-se para o parâmetro de luminosidade ( $L^*$ ) e cromaticidade ( $b^*$ ), que as formulações do pão com Cv 2,5% e Cv 3,75% não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Em relação à tonalidade verde  $a^*$ , as formulações com Cv 3,75% e 5% não são significativamente diferentes entre elas ( $p < 0,05$ ). A còdea da formulação controlo apresentou um valor médio de  $L^*$  de 68,71%, significativamente ( $p < 0,05$ ) superior ao obtido para os pães com incorporação de Cv, correspondente a uma coloração mais clara. Em relação ao parâmetro de cromaticidade ( $b^*$ ), foi possível verificar para a còdea que todas as formulações se apresentaram numa localização no espaço de cor na zona do amarelo, que correspondem a valores positivos para a coordenada  $b^*$ . A diferença de cor entre a còdea do pão com 2,5% e com 3,75% Cv é muito pequena, por isso, o olho humano não consegue distinguir entre as duas ( $< 3,3$ ). Mas a diferença de cor entre a còdea do pão com 3,75% e com 5% Cv é elevada (11,3), assim, o olho humano consegue detetar as diferenças (Odaira, 2011).





Figura 37 - Côdea dos pães: Mix Comercial; Controlo; Cv 2.5%; Cv 3.75%; Cv 5%.

### 3.3.7. Análise da atividade da água, humidade, volume e perdas na cozedura do pão

Na Tabela 14 resumem-se os parâmetros resultantes da avaliação da atividade da água, humidade, volume e perdas na cozedura do pão das formulações estudadas.

Tabela 14 - Valores da atividade da água, humidade, volume e perdas na cozedura dos pães estudados.

\* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as formulações ( $p < 0,05$ ). O mix comercial e perdas na cozedura não foram considerados na ANOVA.

	$a_w$	Humidade (%)	Volume (cm <sup>3</sup> )	Perdas na Cozedura (%)
<b>Mix Comercial</b>	$0,962 \pm 0,003$	$50,77 \pm 1,01$	-	17,9
<b>Controlo</b>	$0,973 \pm 0,004$ a,b	$45,45 \pm 1,67$ f,g,k	$6870 \pm 61$ n	19,0
<b>Cv 2,5%</b>	$0,977 \pm 0,014$ a,c,d	$44,42 \pm 1,48$ f,i,l	$6880 \pm 76$ n	17,5
<b>Cv 3,75%</b>	$0,994 \pm 0,005$ b,c,e	$46,07 \pm 2,66$ g,i,m	$6690 \pm 10$ o	17,6
<b>Cv 5%</b>	$0,968 \pm 0,010$ d,e	$47,23 \pm 0,85$ k,l,m	$6680 \pm 30$ o	19,6

Verifica-se que a atividade da água ( $a_w$ ) de todas as amostras é elevada, próxima de 1, sem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), assim, a adição de Cv não tem impacto na atividade da água. Em valores de  $a_w$  abaixo de 0,5, não ocorre proliferação microbiana. Estes valores elevados (aproximadamente 0,9) tornam o pão pouco estáveis em termos microbiológicos (Castro, 2003). No estudo elaborado por Correia *et al.* (2017) obteve-se valores de  $a_w$  semelhantes ( $a_w = 0,91$ ) para o pão sem glúten. Segundo a literatura, a atividade de água do pão com glúten é de 0,96 (Schmidt, 2007).

Em relação à humidade do pão, verifica-se que os valores são elevados, não sendo significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Observa-se uma relação entre o teor de microalga e o teor de humidade, isto é, a incorporação de maiores teores de Cv aumenta a humidade dos pães. No estudo elaborado por Correia *et al.* (2017) obteve-se valores de humidade mais baixos (aproximadamente 34%) para o pão sem glúten, possivelmente por não ter sido incorporada microalga.

O pão que apresentou maior perda na cozedura foi o pão com Cv 5%, enquanto que o pão com menor perda na cozedura foi o pão Cv 2,5%, provavelmente devido ao



elevado teor de água que a microalga absorve e que, posteriormente, é evaporada. As perdas na cozedura foram calculadas de acordo com o peso antes e depois da cozedura, através da seguinte equação:

$$\text{Perdas na cozedura (\%)} = \frac{\text{Peso antes da cozedura} - \text{Peso depois da cozedura}}{\text{Peso antes da cozedura}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

No estudo elaborado por Correia *et al.* (2017) obtiveram-se valores de perdas na cozedura mais baixos (aproximadamente 10%) para o pão sem glúten, possivelmente por não ter sido incorporada microalga.

O volume do pão controlo não é significativamente diferente do pão Cv 2,5%, e o volume do pão Cv 3,75% e Cv 5% também não é ( $p < 0,05$ ). Observa-se que o volume do pão (Tabela 14) com 2,5% de Cv (6880 cm<sup>3</sup>) é ligeiramente superior ao volume do pão controlo (6870 cm<sup>3</sup>), e muito superior ao volume do pão com 3,75% de Cv (6690 cm<sup>3</sup>) e 5% de Cv (6680 cm<sup>3</sup>). Este facto pode ser explicado pelo estudo de Graça *et al.*, (2018) sobre a incorporação de *Chlorella vulgaris* no pão de trigo, que mostra que a microalga tem um impacto no volume do pão, bem como na estrutura dos alvéolos do miolo. A estrutura interna do pão com Cv revelou um aumento no tamanho das células de gás, comparado ao pão controlo, indicando que a incorporação de microalgas perturba as estruturas internas da massa. No entanto, a partir de 3,0 g Cv/100 g de farinha de trigo, a estrutura da massa é de alguma forma perturbada, o que resultou numa menor força da massa e menor volume do pão, como relatado anteriormente para a adição de outras fontes de proteína ao pão (Mis *et al.*, 2012).

### 3.4. Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada aos pães desenvolvidos com incorporação de 2,5% e 3,75% de *C. vulgaris* pelo facto de apresentarem, em geral, as características finais pretendidas (Figura 38). O pão com 5% de Cv apresenta um sabor e odor acentuado, como tal não foi escolhido para a análise sensorial. Como termo de referência, foi também aplicada a análise sensorial ao pão controlo (Figura 38). Para tal utilizou-se o modelo de ficha de prova que avalia os atributos cor, aroma, sabor, textura, intenção de compra e apreciação global, apresentada no Anexo I. A representação gráfica da Figura 39 apresenta os resultados da análise sensorial efetuada às três amostras de pão selecionadas, de acordo com os atributos considerados.



Figura 38 - Pães analisados sensorialmente: controle, Cv 2,5% e Cv 3,75%.

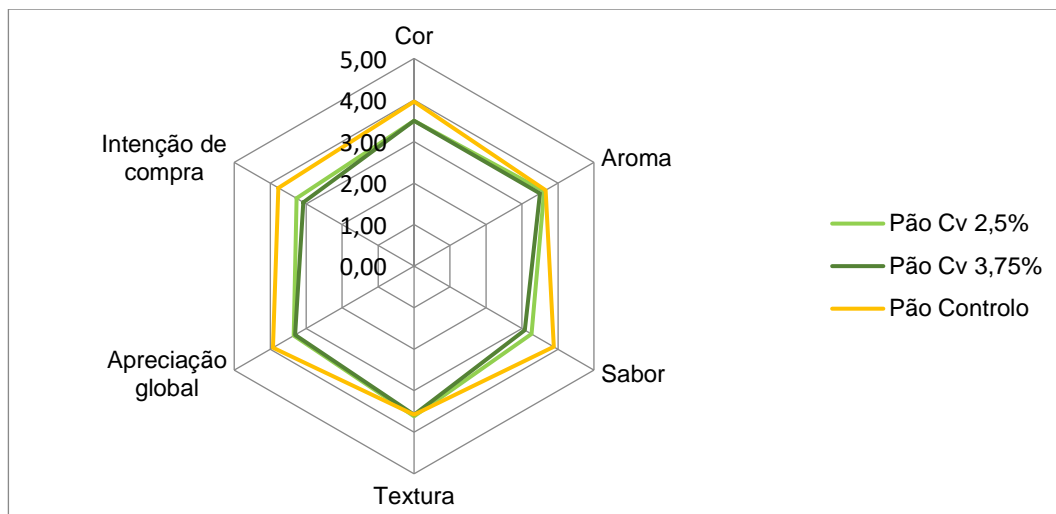


Figura 39 - Respostas dos provadores do painel sensorial (n = 26) em relação ao pão controle e aos pães com Cv 2,5% e Cv 3,75%.

Através da Figura 39 observa-se que os dois pães com incorporação de *C. vulgaris* conseguiram uma classificação semelhante, mas em termos gerais foi o pão controle que conseguiu uma melhor classificação na generalidade dos atributos. Quanto ao atributo apreciação global, os pães incorporados com *C. vulgaris* tiveram uma classificação de 3 pontos (indiferente), enquanto que o pão controle teve uma classificação de 4 pontos (agradável). Quanto ao atributo da textura, os três pães obtiveram a mesma classificação de 4 pontos (agradável). Relativamente à intenção de compra, os provadores transmitiram que não sabem se comprariam os dois pães com a alga (3 valores) e provavelmente comprariam (4 valores) o pão controle.

O painel de provadores utilizado para este estudo não continha pessoas celíacas. Como o principal público-alvo são as pessoas celíacas, é de extrema importância que futuros estudos contenham um painel de provadores celíacos.

#### 4. CONCLUSÕES

A realização da presente dissertação permitiu verificar que a incorporação da microalga *Chlorella vulgaris* originou pães com características tecnológicas e sensoriais desejáveis.

No desenvolvimento da receita controlo, verificou-se que o tempo de amassadura e o tempo-temperatura de cozedura não influenciam significativamente a firmeza e coesividade do pão. Também se verificou que a adição de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) favorece o aumento do volume, no entanto, diminui a firmeza e a coesividade dos pães, concluindo-se que a HPMC melhora a estrutura do pão e torna o miolo mais macio. Nesta fase, o pão que revelou melhores características foi o pão com 8 minutos de amassadura, cozedura a 160°C durante 60 minutos e 1,5% de HPMC.

A determinação do teor de água das formulações, permitiu concluir que a absorção de água das formulações incorporadas com Cv aumentou devido à presença de extra de proteína da microalga, isto é, as massas com Cv necessitam de mais água para atingir a consistência desejada.

Em relação à fase de incorporação da alga *Chlorella vulgaris*, concluiu-se que a sua adição provoca um aumento da firmeza e adesividade na massa não fermentada, comparativamente ao controlo. No caso do pão, verificou-se que a adição de Cv aumenta a sua firmeza, no entanto, diminui a sua coesividade. É possível que, ao serem adicionadas à massa, as microalgas absorvam mais água, reforçando a estrutura interna do produto. Contudo, não se verificam diferenças significativas entre a formulação controlo e as formulações com a alga, concluindo-se que diferentes níveis de incorporação de biomassa microalgal têm um impacto reduzido nestes parâmetros de textura.

Ao nível das propriedades viscoelásticas, as massas com adição da alga, principalmente, a Cv 2,5% e 5% mostraram valores de componentes viscoelásticas superiores relativamente à massa controlo, verificando-se assim que possuem um grau de estruturação superior, que deverá resultar da adição da microalga com um conteúdo elevado de proteína. Verificou-se que todas as massas demonstram um comportamento predominantemente elástico, embora com valores baixos dos módulos viscoelásticos.

Em termos de cor, concluiu-se que ao adicionar *C. vulgaris* os pães adquirem uma cor mais escura e verde, o que está de acordo com o esperado, tendo em conta a coloração desta microalga.

Em relação ao volume do pão, constatou-se que o volume do pão com 2,5% de Cv é ligeiramente superior ao do pão controlo, e muito superior ao volume do pão com

3,75% de Cv e 5% de Cv. Concluiu-se que a microalga tem um impacto positivo no volume do pão, bem como na estrutura dos alvéolos do miolo. No entanto, a partir de um certo teor, a estrutura da massa é perturbada, o que resulta num menor volume do pão.

A análise sensorial permitiu saber qual a preferência dos provadores entre as formulações selecionadas - controlo, Cv 2,5% e Cv 3,75% - pelo facto de apresentarem, em geral, as características finais pretendidas. Verificou-se que o pão com 5% de Cv apresenta um sabor e odor acentuado, como tal não foi escolhido para a análise sensorial. Concluiu-se que os dois pães com incorporação de *C. vulgaris* (2,5% e 3,75%), conseguiram uma classificação semelhante, mas em termos gerais foi o pão controlo que conseguiu uma melhor classificação na generalidade dos atributos. Em relação à intenção de compra, os provadores transmitiram que não sabem se comprariam os dois pães com a alga e provalmente comprariam o pão controlo. Como o painel de provadores utilizado para este estudo não continha pessoas celíacas, é de extrema importância que futuros estudos tenham exclusivamente um painel de provadores celíacos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvelos, H.M., (2002), *Análise, Desenvolvimento e Teste de Métodos e Técnicas para Controlo Estatístico em Análise Sensorial*, Universidade do Porto, pp 1-50 e 81-94
- APC. Associação Portuguesa de Celíacos (2018). Disponível em <http://www.celiacos.org.pt/> Acesso em: 10 de Julho de 2018.
- Atwell, W. A., (2001), *Wheat Flour*. Eagen Press Handbook Series. American Association of Cereal Chemists, 1<sup>st</sup> edition.
- Bai, J., Zeballos, E., Fried, M., Corazza, G., Schuppan, D., Farthing, M., *et al.*, (2007), *World Gastroenterology Organisation (WGO) Practice Guidelines: Celiac Disease*. New York (US): World Gastroenterology Organisation, pp. 18.
- Baking Quality AACC International Method 10-05.01., (2001), *Guidelines for Measurement of Volume by rapseed Displacement*, pp. 1-4.
- Batista, A.P., *et al.*, (2017), *Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility*. Algal Research, vol. 16, pp. 161-171.
- Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M., Raymundo, A., (2013), *Comparison of microalgal biomass profiles as a novel functional ingredient for food products*, Algal Research 2, pp. 164–173
- Batista, A. P., Gouveia, L., Nunes, M. C., Franco, J. M., & Raymundo, A., (2008), *Microalgae biomass as a novel functional ingredient in mixed gel systems*. P. A. Williams, & G. O. Phillips (Vol. Eds.), Gums and stabilizers for the food industry: Vol. 14, pp. 487–494. Cambridge, UK: RSC Publishing.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., (2009), *Food Chemistry*. Springer, 4<sup>th</sup> edition, pp. 724.
- Bernaerts, T. M.M, *et al.*, (2017), *Microalgal biomass as a (multi)functional ingredient in food products: Rheological properties of microalgal suspensions as affected by mechanical and thermal processing*. Algal Research, vol.25, pp. 452–463
- Bloksma, A.H., Bushuk, W., (1988), *Reology and Chemistry of dough*. Pomeranz, Y. (ed.) Wheat – Chemistry and Technology. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, St.Paul, Vol.2.
- Butcher, E.W., (1959), *Microalgae for human and animal consumption*. Microalgal technology. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J., (Eds), Cambridge, Cambridge University Press, pp. 226-256.
- Cabrera-Chávez, F., *et al.*, (2010), *Modification of gluten by methionine binding to prepare wheat bread with reduced reactivity to serum IgA of celiac disease patients*. Journal of Cereal Science, vol.52, pp.310-313
- Carini, E., Scazzina, F., Curti, E., Fattori, F., Mazzeo, T., Vittadini, E., (2015), *Physicochemical, sensory properties and starch in vitro digestion of gluten-free breads*. Int J Food Sci Nutr, vol. 66(8), pp. 867–872.
- Carlson, S., (2011), *Original Submission: GRAS exemption claim for Chlorella vulgaris as an ingredient in foods*, Food and Drug Administration.
- Castro, A., (2003), *A Química e a Reologia no Processamento de Alimentos* (Ciência e Técnica) Lisboa. pp. 15-61.
- Catassi C., Fasano A., (2014), *Nutrition and Celiac disease*. Journal Nutrients (ISSN 2072-6643), pp. 92-220.

Catassi C., Fasano A., (2008), *Celiac disease*. Gluten-free cereal products and beverages, California: Elsevier, Academic Press, pp 6–8.

Comissão Europeia. Regulamento (CE) n° 231/2012 de 9 de março de 2012 que estabelece especificações para os aditivos alimentares enumerados nos anexos II e III do Regulamento (CE) n° 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:083:0001:0295:PT:PDF> Acesso em: 15 de Agosto de 2018.

Correia, P., Fonseca, M., Batista, L., Guiné, R., (2017), *Production of a new gluten-free bread and comparison with a regular wheat bread*. International Congress on Engineering. Universidade da Beira Interior.

Di Sabatino, A., Corazza, GR., (2009), *Coeliac disease*. The Lancet, vol. 373(9673), pp. 1480-93.

Du Pont, (2018), *Big gluten-free bread is a matter of timing*. Disponível em: <http://www.danisco.com/food-beverages/bakery/gluten-free/videos/#c27412> Acesso em: 1 de Março de 2018.

Ediger, T.R., Hill, I.D., (2014), *Celiac disease*. Vol. 35, Issue 10. Disponível em: <http://pedsinreview.aappublications.org/content/35/10/409> Acesso em: 2 de Agosto de 2018.

EFSA. European Food Safety Authority (2015). *Safety of a change in specifications for the food additive hydroxypropyl methyl cellulose (E 464)*. EFSA Journal.

FAO. Food and Agriculture Organization. *Hydroxypropylmethyl Cellulose* (2011). Disponível em: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/jecfa\\_additives/docs/monograph11/additive-233-m11.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph11/additive-233-m11.pdf). Acesso: 11 de Julho de 2018.

Fradique, M., Batista, AP., Nunes, MC., Gouveia, L., Bandarra, NM., Raymundo, A., (2010), *Incorporation of Chlorella vulgaris and Spirulina maxima biomass in pasta products*. Part 1: preparation and evaluation. J Sci Food Agric, vol. 90, pp. 1656–64.

Friedman, H.H., Whitney, J.E., Szczesniak, A.S., (1963), *The texturometer – a new instrument for objective texture measurement*. J. Food Sci., vol. 28, pp. 390-396.

Gary, J.A., Bemiller, J.N., (2003), *Bread Staling: Molecular Basis and Control*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol.2.

Gouveia, L., Batista, A. P., Miranda, A., Empis, J., & Raymundo, A., (2007), *Chlorella vulgaris biomass used as colouring source in traditional butter cookies*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, vol. 8, pp. 433–436.

Gouveia, L., Batista, A. P., Raymundo, A., Sousa, I., & Empis, J., (2006), *Chlorella vulgaris and Haematococcus pluvialis biomass as colouring and antioxidant in food emulsions*. European Food Research and Technology, vol. 222, pp. 362–367.

Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, AP., Sousa, I., Empis, J., (2005), *Chlorella vulgaris and Haematococcus pluvialis biomass as colouring and antioxidant in food emulsions*. Eur Food Res Technol, vol. 222, pp. 362–7.

Graça, C., Fradinho, P., Sousa, I., Raymundo, A., (2018), *Impact of Chlorella vulgaris on the rheology of wheat flour dough and bread texture*. Food Science and Technology, vol.89, pp. 466-474.

Heller, L., 2009, *Commercial aspects of gluten-free products*. In: Gallagher, E. (ed) Gluten-free Foods Science and Technology. Wiley-Blackwell Publishing, Oxford., pp. 99- 106.

Hogen Esch, C.E., Kiefte-de Jong, J.C., Hopman, E.G.D., Koning, F., Mearin M.L., (2008), *Strategies for Prevention of Celiac Disease*. Frontiers in Celiac Disease, vol.12, pp. 188-197.

ISO (1992) ISO 5492: Sensory analysis – Vocabulary, 1a Ed., International Organization for Standardization.

ISO (2003) ISO 13299: Sensory analysis – Methodology – General Guidance for establishing a sensory profile, 1st Ed., International Organization for Standardization.

ISO (2005) ISO 6658: Sensory analysis – Methodology – General Guidance, 2a Ed., International Organization for Standardization.

Lee, A., Newman, J.M., (2003), *Celiac diet: its impact on quality of life*. J Am Diet Assoc., vol.103 (11), pp. 1533-1535.

Mancebo, C. M., Miguel, M. A. S., Martinez, M. M., & Gomez, M., (2015), *Optimisation of rheological properties of gluten-free doughs with HPMC, psyllium and different levels of water*. Journal of Cereal Science, vol. 61, pp. 8 e 15.

Matos, ME., Rosell, CM., (2012), *Quality Indicators of Rice-Based Gluten-Free Bread-Like Products: Relationships Between Dough Rheology and Quality Characteristics*. Food Bioprocess Technol, vol. 6, pp. 2331–2341.

Mir, S.A., Shah, M.A., Naik, H.R., Zargar, I.A., (2016), *Influence of hydrocolloids on dough handling and technological properties of gluten-free breads*. Trends in Food Science & Technology, vol. 51, pp. 49-57.

Mis, A., Grundas, A., Dziki, D., & Laskowski, J., (2012), *Use of farinograph measurements for predicting extensograph traits of bread dough enriched with carob fibre and oat wholemeal*. Journal of Food Engineering, vol. 108, pp. 1–12.

Mohammed, I., Ahmed, A. R., & Senge, B., (2012), *Dough rheology and bread quality of wheat- chickpea flour blends*. Industrial Crops and Products, vol. 36, pp.196–202.

Naqash, F., *et al.*, (2017), *Gluten-free baking: Combating the challenges - A review*. Trends in Food Science & Technology, vol.66, pp. 98 e 107.

Nascimento, K.; Barbosa, M.; Takeiti, C., (2012), *Doença Celíaca: Sintomas, Diagnóstico e Tratamento Nutricional*. Revisão de literatura. Saúde em Revista.

Ngemakwe, P.H., Roes-Hill, M.L., Jideani, V.A., (2014), *Advances in gluten-free bread technology*. Food Science and Technology International, vol. 21(4), pp. 256–276.

Odaira, Chikayuki, Itoh, Ishibashi, (2011), *Clinical Evaluation of a Dental Color Analysis System: The Crystaleye Spectrophotometer?* Journal of Prosthodontic Research, vol. 55 (4), pp. 199-205. Japan Prosthodontic Society.

Panahi, Y., Darvishi, B., Jowzi, N., Beiraghdar, F., Sahebkar, A., (2016), *Chlorella vulgaris: A multifunctional Dietary Supplement with Diverse Medicinal Properties*. Curr Pharm Des., Vol.22 (2), pp.164-173.

Perten Instruments, Method Description micro-doughLAB Method 01.02. Disponível em: <https://www.perten.com/Global/Application%20notes/mdL/General%20Flour%20Testing%20Method%20-%20micro-doughLAB%2001.02.pdf> . Acesso em: 16 de Agosto de 2018.

Piteira, F., Nunes, M. C., Raymundo, A., & Sousa, I., (2004), *Effect of principal ingredients on quality of cookies with dietary fibre*. In P. A. Williams & G. O. Philips (Eds.), Gum and stabilisers for the food industry, Vol. 12, pp. 475–483. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.

Preichardt, L.D., Gulart, M.A., (2013), *Gluten formation: Its sources, composition and health effects*. Gluten, Nova Science publishers, vol., chapter III, pp. 55-70.

Raymundo, A., Gouveia, L., Batista, A. P., Empis, J., & Sousa, I., (2005), *Fat mimetic capacity of Chlorella vulgaris biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein*. Food Research International, vol. 38, pp. 961–965.

Rogers, D.E., Zeleznak, K.J., Lai, C.S., Hosene, R.C., (1988), *Effect of Native Lipids, Shortening, and Bread Moisture on Bread Firming*. Cereal Chem., vol. 65(5), pp. 398-401.

Ronda, F., Perez-Quirce, S., Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G., (2015), *Effect of barley and oat  $\beta$ -glucan concentrates on gluten-free rice-based doughs and bread characteristics*. Food Hydrocolloids, vol. 48, pp. 197 e 207.

Sabanis, D., Tzia, C., (2011), *Selected Structural Characteristics of HPMC-Containing Gluten Free Bread: A Response Surface Methodology Study for Optimizing Quality*, International Journal of Food Properties, vol. 14:2, pp. 417-431.

Safefood 360, Inc., (2014), Water Activity (aw) in Foods. Disponível em: <http://safefood360.com/resources/Water-Activity.pdf>. Acesso em: 10 de Julho de 2018.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.Y., Vaca-Garcia, C., (2014), *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, vol. 35, pp. 265–278.

Scheuer, P.M.; Francisco, A.; Miranda, M. Z., et al., (2011), *Wheat: characteristics and baking use*. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, vol.13(2), pp. 211-222.

Schmidt, S.J., (2007). Water mobility in foods. In: Barbosa-Canovas, G.V., Schmidt, S.J., Labuza, T.P. (Eds.), Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA.

Schofield, J.D., Bottomley, R.C., Timms, M.F., Booth, M.R., (1983). Cereal Science, vol. 1, pp. 241.

Sousa, I., (2001), *A Reologia dos Produtos Alimentares*. Reologia e suas Aplicações Industriais, pp. 131-157, Gomes de Castro, A., Covas, J.A., Diogo, A.C. Instituto Piaget, Lisboa.

Sousa, I., (2010), *Protocolos e problemas para as aulas práticas de Reologia e Estrutura dos Alimentos*. Instituto Superior de Agronomia.

Struyf, N., der Maelen, E.V., Hemdane, S., Verspreet, J., Verstrepen, K.J, Courtin, C.M., (2017), *Bread Dough and Baker's Yeast: An Uplifting Synergy*.

Texture Technologies. Disponível em: <http://texturetechnologies.com/texture-analyzers/ta-xtplus-texture-analyzer>. Acesso em: 16 de agosto de 2018.

Texture Technologies. Disponível em: <http://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis#tpa-measurements>. Acesso em: 16 de agosto de 2018.

The Dow Chemical Company, (2011), *Gluten Free Bread*.

The Dow Chemical Company, (2014), *The Properties of Our Product Family Facilitate for Effective Replacement of Xanthan While Offering Some Improved Benefits*. Gluten Replacement – Bringing Back Shape, Structure and Moistness, pp. 11.

Thermo Fisher Scientific. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/379-0340>. Acesso: 16 de agosto de 2018.

UTEX. University of Texas at Austin. Cultural Collection of Algae. Disponível em: <https://utex.org/products/utex-0026>. Acesso em: 15 de Agosto de 2018.



UE (1997a). Regulamento (CE) No 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Janeiro de 1997 sobre novos alimentos e novos ingredientes alimentares.

UE (2015). Regulamento (CE) No 2283/2015 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Novembro de 2015 relativo a novos alimentos.

UTEX. University of Texas at Austin. Cultural Collection of Algae. Disponível em: <https://utex.org/products/utex-lb-0232>. Acesso em: 15 de Agosto de 2018.

Wang, X., Choi, S., Kerr, WC., (2004), *Water dynamics in white bread and starch gels as affected by water and gluten content*. Swiss Society of Food Science and Technology, vol. 37, pp. 377–384.

Wang, K., Lu, F., Li, Z., Zhao, L., Han, C., (2017), *Recent developments in gluten-free bread baking approaches: a review*. Food Sci. Technol, Campinas, vol. 37(Supl. 1), pp. 1-9.

Zandonadi, RP., *et al.*, (2009), *Psyllium as a substitute for gluten in bread*. Journal of the American Dietetic Association, vol.109, pp.1781-1784.

Zevallos, V.F., Herencia, L.I., Ciclitira, P.J., (2013), *Quinoa, Coeliac Disease and Gluten-Free Diet*. State of the art report on quinoa around the world in 2013, Chapter 3.6, pp.300-313.

## ANEXOS

### Ficha de Prova de Análise Sensorial para os pães sem glúten

#### **Código da amostra:**

Assinale com um X a classificação que acha mais adequada para cada atributo.

#### **Cor**

- ☐ Muito agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Indiferente
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito desagradável

#### **Aroma**

- ☐ Muito agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Indiferente
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito desagradável

#### **Sabor**

- ☐ Muito agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Indiferente
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito desagradável

#### **Textura**

- ☐ Muito agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Indiferente
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito desagradável

#### **Apreciação global**

- ☐ Muito agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Indiferente
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito desagradável

#### **Intenção de compra**

- ☐ Compraria de certeza
- ☐ Provavelmente compraria
- ☐ Não sei se compraria
- ☐ Provavelmente não compraria
- ☐ Não compraria de certeza

#### **Observações:**

#### **Análise comparativa das amostras**

Ordene as amostras por ordem de preferência:

\_\_\_\_\_   
Gostei menos

\_\_\_\_\_   
Gostei mais

#### **Observações:**

---

## GLUTEN-FREE BREAD WITH MICROALGAE BIOMASS ADDITION

**M. Cristiana Nunes<sup>1</sup>, Joana Duarte<sup>1</sup>, Carlos Cardoso<sup>2</sup>, Cláudia Afonso<sup>2</sup>, Narcisa Bandarra<sup>2</sup>, Isabel Sousa<sup>1</sup>, Anabela Raymundo<sup>\*1</sup>**

<sup>1</sup> Universidade de Lisboa / Instituto Superior de Agronomia, LEAF-Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food / Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal. [anabraymundo@isa.ulisboa.pt](mailto:anabraymundo@isa.ulisboa.pt)

<sup>2</sup> Portuguese Institute for the Sea and Atmosphere (IPMA, IP), Division of Aquaculture and Upgrading (DivAV) / Rua Alfredo Magalhães Ramalho, 6, 1495-006 Lisbon, Portugal.

### Abstract:

The increasing demand for bioactive foods has been highly valued in recent years. Microalgae are already recognized as an important source of phytochemicals, that may benefit health beyond the role of basic nutrition, with remarkable functional activity. The level of technological processing applied should be considered when using microalgae as food ingredients, since the mechanical and thermal food processing conditions may imply a certain degradation of the bioactive compounds. Besides nutrition, introducing microalgae biomass in food systems, can also impart significant changes in its rheological properties, as it had been previously reported by our research team in different food systems [1-4], including wheat bread [5].

Gluten-free products are finding an increased demand since the incidence of celiac disease or other gluten-associated allergies. However, baking without gluten is a technological challenge, due to gluten-free flours' inability to form viscoelastic doughs with good baking performance.

This work is part of Algae2Future project that intends to explore the microalgae potential to be a low-carbon-footprint healthy food and feed ingredient. The use of *Chlorella vulgaris* and *Tetraselmis chuii* biomass to enriched gluten-free bread, based on a maize starch and rice flour formulation, was studied with technological and nutritional advantages. To evaluate the impact of microalga addition on the dough and bread structure, empirical and fundamental rheology methods were used. For assessing bioaccessibility, an *in vitro* digestion model was chosen for the determination of bioaccessibility in microalgae biomass and in respective bread.

Acknowledgments: Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT), UID/AGR/04129/2013 – LEAF; Research Council of Norway, Algae to Future (A2F) Project.

Keywords: Microalgae, gluten-free bread, rheology, bioaccessibility.

### References:

- [1] Batista, A.P., Raymundo, A., Sousa, I., Empis, J. (2006). Food Hydrocolloids, 20: 44-52.
  - [2] Gouveia, L., Batista, A.P., Raymundo, A., Bandarra, N. (2008a). Nutrition and Food Science, 38: 492-501.
  - [3] Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Sousa, I., Raymundo, A., Cordobés, F., Guerrero, A., Franco, J.M. (2011). Food Hydrocolloids, 25: 817-825.
  - [4] Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Raymundo, A. (2010). Journal of the Science of Food and Agriculture, 90: 1656-1664.
  - [5] Graça, C., Fradinho, P., Sousa, I., Raymundo, A. (2018). LWT - Food Science and Technology, 89: 466–474.
-

# INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL EM PÃO ISENTO DE GLÚTEN: AVALIAÇÃO DO IMPACTO NA ESTRUTURA

**M. Cristiana Nunes, Joana Duarte, Isabel Sousa, Anabela Raymundo**

*Universidade de Lisboa / Instituto Superior de Agronomia, LEAF-Linking Landscape,  
Environment, Agriculture and Food / Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal.  
anabraymundo@isa.ulisboa.pt*

## Resumo:

O crescente aumento do número de doentes celíacos a nível mundial tem promovido o interesse nos produtos isentos de glúten. A produção de pão sem glúten representa um desafio para os investigadores e para a indústria, uma vez que o glúten tem um papel essencial no desenvolvimento da estrutura viscoelástica característica do pão. Nos últimos anos, as estratégias de substituição do glúten em massas panares têm passado pela utilização de novas farinhas, agentes de textura, ingredientes funcionais, técnicas de panificação alternativas e combinação de todos estes métodos.

Por outro lado, também tem aumentado a procura de alimentos com ingredientes bioativos e as microalgas são reconhecidas como fonte de inúmeros fitoquímicos com impacto positivo na saúde humana. De facto, as microalgas representam um ingrediente alimentar sustentável com grande interesse no contexto das alterações climáticas existentes. No entanto, a incorporação de microalgas em matrizes alimentares pode conduzir a alterações nas propriedades reológicas dos alimentos, para além do valor nutricional, como tem sido demonstrado para diversos produtos [1-4], incluindo pão tradicional [5].

Neste trabalho, pretende-se avaliar o impacto da incorporação de *Chlorella vulgaris* e *Tetraselmis chuii* na estrutura de pão isento de glúten à base de amido de milho e farinha de arroz. O gelificante HPMC (hidroxipropilmetilcelulose) foi usado para aumentar a viscosidade da massa e melhorar o volume, textura e qualidade geral dos pães obtidos. Utilizaram-se métodos reológicos empíricos para determinar a capacidade da absorção de água das misturas de farinhas e microalgas (MicrodoughLab) e a textura final das massas e pães obtidos (Análise de Perfil de Textura no Texturómetro), assim como métodos reológicos fundamentais (varrimentos de frequência num Reómetro de tensão controlada). Avaliou-se ainda o impacto da adição de microalgas na cor, volume, atividade da água e humidade dos pães isentos de glúten.

Concluiu-se que a adição de biomassa microalgal em formulações de pão isento de glúten representa uma estratégia interessante para aumentar o valor nutricional e a bioatividade dos produtos, apesar do impacto na estrutura depender do tipo de microalga usado.

Agradecimentos: Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), UID/AGR/04129/2013 – LEAF; Research Council of Norway, Algae to Future (A2F) Project.

## Referências:

- [1] Batista, A.P., Raymundo, A., Sousa, I., Empis, J. (2006). Food Hydrocolloids, 20: 44-52.
- [2] Gouveia, L., Batista, A.P., Raymundo, A., Bandarra, N. (2008a). Nutrition and Food Science, 38: 492-501.
- [3] Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Sousa, I., Raymundo, A., Cordobés, F., Guerrero, A., Franco, J.M. (2011). Food Hydrocolloids, 25: 817-825.
- [4] Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Raymundo, A. (2010). Journal of the Science of Food and Agriculture, 90: 1656-1664.
- [5] Graça, C., Fradinho, P., Sousa, I., Raymundo, A. (2018). LWT - Food Science and Technology, 89: 466-474.